

Derivatives of soluble T-4.

Publication number: JP2503269T

Publication date: 1990-10-11

Inventor:

Applicant:

Classification:






- international: C12N15/09; A61K38/00; A61P31/12; C07K14/00;
C07K14/725; C07K14/73; C07K16/28; C12N5/10;
C12P21/02; C12R1/91; C12N15/09; A61K38/00;
A61P31/00; C07K14/00; C07K14/435; C07K16/18;
C12N5/10; C12P21/02; A61K38/00; (IPC1-7):
A61K37/02; C07K13/00; C12N5/10; C12N15/48;
C12P21/02

- european: C07K14/705B14; C07K16/28A14

Application number: JP19890503131 19890224

Priority number(s): US19880160348 19880224

Also published as:

 EP0330227 (A2)
 WO8908143 (A1)
 EP0330227 (A3)
 PT89838 (B)
 HU213019 (B)

more >>

Report a data error here

Abstract not available for JP2503269T

Abstract of corresponding document: **EP0330227**

This invention provides a therapeutic agent capable of specifically forming a complex with human immunodeficiency virus envelope glycoprotein which comprises a polypeptide. In one embodiment of the invention, the amino acid sequence of the polypeptide comprises the amino acid sequence shown in Figure 6 from about +3 to about +185 fused to the amino acid sequence from about +351 to about +369. In another embodiment of the invention, the amino acid sequence of the polypeptide comprises the amino acid sequence shown in Figure 6 from about +3 to about +106 fused to the amino acid sequence from about +351 to about +369. In yet a further embodiment of the invention, the amino acid sequence of the polypeptide comprises the amino acid sequence shown in Figure 6 from about +3 to about +185. This invention also provides a method for treating a subject infected with a human immunodeficiency virus. The method comprises administering to the subject an effective amount of a pharmaceutical composition comprising an effective amount of a therapeutic agent of the invention and a pharmaceutically acceptable carrier.

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願号

⑫ 公表特許公報(A)

平2-5(

⑬ 公表 平成2年(1990)

⑭ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

審査請求 未請求
予備審査請求 未請求

部門(区分)

C 12 P 21/02

C

8214-4B

8717-4B

6807-4B

C 12 N

15/00

5/00

A

B※

(全

⑯ 発明の名称 可溶性T4の誘導体

⑰ 特 願 平1-503131

⑱ 翻訳文提出日 平1(1989)10月24日

⑲ 出 願 平1(1989)2月24日

⑳ 国際出願 PCT/US89/00762

㉑ 国際公開番号 WO89/08143

㉒ 国際公開日 平1(1989)9月8日

優先権主張 ⑳ 1988年2月24日㉑ 米国(US)㉒ 160,348

㉓ 発 明 者 マドン, ボール・ジェイ

アメリカ合衆国、ニュー・ヨーク・10032、ニュー・ヨーク、
ブロンクス・アベニュー・60

㉔ 出 願 人 ザ・トラステイズ・オブ・コ
ロンビア・ユニヴァーシティ・
イン・ザ・シティ・オブ・ニュ
ー・ヨーク

アメリカ合衆国、ニュー・ヨーク・10027、ニュー・ヨーク、
スト・ワンハンドレッド・アンド・シックスティーンズ・ス
ト・アンド・ブロードウェイ (番地なし)

㉕ 代 理 人 弁理士 川口 義雄 外2名

㉖ 指定国 AU, DK, FI, HU, JP, KR, NO

最終頁に続く

序言(内容に変更なし)

請求の範囲

(1) ヒト免疫不全ウイルスエンベロープタンパク質と特異的に結合体形成可能な誘導剤であって、ポリペプチドから成り、そのアミノ酸配列は表6に示すアミノ酸配列の約+3から約+185までが約+351から約+369までのアミノ酸配列に融合したものであることを特徴とする誘導剤。

(2) ヒト免疫不全ウイルスエンベロープタンパク質と特異的に結合体形成可能な誘導剤であって、ポリペプチドから成り、そのアミノ酸配列は表6に示すアミノ酸配列の約+3から約+106までが約+351から約+369までのアミノ酸配列に融合したものであることを特徴とする誘導剤。

(3) ヒト免疫不全ウイルスエンベロープタンパク質と特異的に結合体形成可能な誘導剤であって、ポリペプチドから成り、そのアミノ酸配列は表6に示すアミノ酸配列の約+3から約+185までのものであることを特徴とする誘導剤。

(4) 請求項1、2又は3のいずれかに記載の誘導剤の含有量と

(5) 請求項1、2又は3のいずれかに記載のポリペプチドをコードする発現ベクター。

(6) 請求項6の発現ベクターから成る宿主細胞。

(7) 細菌宿主細胞である請求項7の宿主細胞。

(8) 大腸菌宿主細胞である請求項8の細菌宿主細胞。

(9) 真核宿主細胞である請求項7の宿主細胞。

(10) 哺乳類宿主細胞である請求項10の真核宿主細胞。

(11) 哺乳類宿主細胞である請求項10の真核宿主細胞。

(12) 昆虫宿主細胞である請求項7の宿主細胞。

(13) 請求項6の発現ベクター系を宿主細胞で育成させ、かくして得られた誘導剤を回収する請求項1、2又は3のいずれかに記載の誘導剤

の限定された発現によって説明できた。

エイズではT4⁺ Tリンパ球の欠失によって細胞免疫が弱くなる。また多くの場合にはエイズに伴って、殆どが亜急性性脳炎(subacute encephalitis)に起因する中枢神経系(CNS)の機能障害が生じる。エイズウイルスのRNA及びpRNAは脳組織から測定され、神経系疾患に罹患した患者の脳及び脳脊髄液からウイルスが単離された。これらの観察は、エイズウイルスが脳細胞に感染し、脳ウイルスがエイズ患者で観察されるCNS病変の直接原因であることを示唆する。従って、エイズは向リンパ性であると同時に向神経性である。従って、T4がCNS中で発現されたのかまたは増加的な脳特異的抗原分子がエイズウイルスのレセプターとして機能するのかを判断することが重要である。

T4及びT8の特異的相互作用の解明は、T4及びT8遺伝子を単離でき、それらの構造を決定し、種々の細胞環境に導入できれば容易に行なわれるであろう。T8分子をコードするcDNAの単離及び配列が最近報告された(19, 20, 21)。決定されたタンパク質配列は、T8が免疫グロブリンL鎖の可変部との相同性を含む4末端ドメインをもつ膜結合糖タンパク質であることを示す。

したヤギ抗マウス免疫グロブリンと共にインキュベートした。細胞をFACS II/Cell Sorterで分析し、FACS II/780コンピュータにより発光の対数値に対する細胞数としてプロットした。非形質細胞H16.3T8細胞及びT細胞は同一のサイトフルオログラフィーパターンを示した。Fig. 2.2はT8⁺、T4⁺、T8⁺、T11⁺の表現型を有する白血病T細胞系であり、LTD-4は全ゲノムDNAの転写産物に待たれるT4⁺ T細胞の形質転換株である。3A-4はT4-pH5tk/neoレトロウイルス発現細胞株で形質転換したH16.3T8細胞系である。

第2図、T4⁺及びT8⁺細胞及びヒト細胞に由来するpRNAのノースザンブロット分析

9µgのポリ(A)⁺ RNA又は12µgの全RNA(葉緑体細胞及び動物リンパ系)を0.8%アガロース-ホルムアルデヒドゲル中で電気泳動させ、GeneScreen (New England Nuclear)に吸着させ、³²Pで標識した0.6kb T4 cDNAインサートでアローブ

発明の要約

本発明は、ポリペプチドを含有するヒト免疫不全ウイルスエンベロープ糖タンパク質との複合体を特異的に形成することが可能な治療剤を提供する。本発明の1態様と、ポリペプチドのアミノ酸配列は約+351〜約+369の第6図に示すアミノ酸配列を含む。本発明の別の態様によると、ポリペプチドのアミノ酸配列は約+351〜約+369のアミノ酸配列を含む。本発明の別の態様によると、ポリペプチドのアミノ酸配列は約+3〜約+185の第6図に示すアミノ酸配列を含む。本発明の更に別の態様によると、ポリペプチドのアミノ酸配列は約+3〜約+185の第6図に示すアミノ酸配列を含む。

本発明は更に、ヒト免疫不全ウイルスに感染した患者の治療方法も提供する。該方法は、有効量の本発明のポリペプチドと医薬上許容可能なキャリアーとを含有する組成物を患者に投与することから成る。

図面の簡易な説明

第1図、pT4及びpT8を用いた免疫免疫蛍光染色のフルオログラフィーパターン

細胞(5×10⁵)をマウスモノクローナル抗体OKT4、OKT8と共にインキュベートし、洗浄し、その後、FITC

標識抗体(100)及びT8抗体(100)リンパ球を含む。ヒトリンパ球を4倍の時間で洗浄し、免疫蛍光を顕微鏡で観察した。

第3図、pT4及びT4遺伝子の制限酵素マッピングとクローニング

A. pT4 pDNA及びT4遺伝子のBam HI制限酵素マッピング。T4遺伝子におけるBam HI制限酵素の制限はサザンブロット分析及びゲノムクローニングにより決定した。pT4及びT4遺伝子の5'末端のアミノ酸配列を点検により決定し、pT4の塩基対の位置を点検により決定した。指示した可変の塩基対はキログラムに列挙する。指示した可変の塩基対はキログラムに列挙する。

B. 配列決定方法。塩基はフラグメントをH13にサブクローニングし、シーケンシング(50)により決定することにより決定した配列範囲を示す。

トランスCはJ配列中に現れている。

B. T4の接合領域(joining region)アミノ酸配列とT細胞抗原レセプター α -鎖のコンセンサスJ配列、イムノグロブリンラムダ及びカッパ鎖、及びヒトT細胞レセプター α -鎖のJ配列とのアラインメント(99)。

C. T4のトランスメンブラン領域とKRCクラスII β -鎖とのアラインメント(100)。増殖上のトランスメンブランドメイン(TN)は配列の下に示されている。

第19図: ヒト染色体DNAのT4遺伝子の制限ヌクレアーゼマッピング

9つのエキソンの位置をゲノムクローニングマップの作成、サザンブロット分析及びヌクレオチド配列によって調べた。リーダー配列(L)、可変領域と思われる領域(V)、接合領域と思われる領域(H)、トランスメンブラン領域(TN)及び細胞質(CYT)領域は線で囲まれている。開始コンセンサス配列で包囲されたメチオニンコードンの位置はリーダーエキソン(L)の冒頭部分に示されている(161)。終止コードTGAは第2細胞質エキソン(CYT)の末尾に示されている。ここに示した大きさの単位はキロベースである。

第20図: 組織とレトロウイルス複製ベクター及び複製細胞

してブロットした。感染ウイルス力価(10⁵-10⁶)は、培養物の50%がウイルスに関して陽性を示す時の希釈度の逆数として示す(47)。自然に分離したT4細胞は、フィトヘマグルチニン(PHA)で刺激された正常淋淋リンパ球(●)とT細胞系CE3(○)とを含む。トランスフェクションにかけられたT4細胞系はHSB2-T4⁺細胞(▲)とHaji-T4⁺細胞(●)とを含む。トランスフェクションにかけられたT8細胞系HSB2-T8⁺及びHaji-T8⁺(○→○)は、これらの検査の対照として使用した。

第21図: T4⁺細胞系複製細胞中のシンシチウム(Syncytium)の形成

A. 2×10⁵の単層HeLa-T4⁺複製細胞を2×10⁵のエイズウイルス感染T9細胞と混合し、32℃でインキュベートした。12時間後に培養物を調べたところ、基層シート中の細胞の90%以上がシンシチウム中に含まれていた。

細胞の形成

ム。組織とレトロウイルス複製ベクター。pMV7は、向で置換的に組み立てられる2つのHologenyホストとsalウイルスLTR(long terminal repeats)を含む。pMV7はB37ナミジンキナーゼプロモーター(Lk)に融合されたホオマイシンホストトランススクリプターゼ遺伝子(hを含む。T4(74B)(70)又はT8(T8F1)(26)をコードする発達のcDNAインサートを矢印の方向に従ってEco RIでブクローンした。矢印T4-pMV7及びT8-pMV7が形成。コーディング配列は影の部分で示されている。ここに大きさの単位はキロベースである。

9. レトロウイルスを介する遺伝子トランスフェクション
第22図: 自然に分離されたT4細胞系複製されたT4細胞

細胞に、10倍ずつで希釈した一連のエイズウイルス物を接種し、37℃で12時間インキュベートし、洗脱マイクロカルチャーでアレーティングした(cultured microculture)。感染後12日目に、感染培養物の細胞ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)に、べた(46)。結果を、陽性培養物対ウイルス感染

細胞選別法

コラムA. 細胞(5×10⁵)をフルオレセイン結合抗体又は抗T8(---)モノクローナル抗体と共にインキュベし、細胞蛍光定量法(cytofluorometry)によって分析した。細胞(5×10⁵)をパッファ(---)又はエイズス(---)と共にインキュベートし、洗浄し、フルン結合抗体エイズウイルス抗体と共にインキュベーション蛍光定量法によって分析した。

コラムC. 細胞(5×10⁵)をパッファ(---)又はエイズウイルスの前の抗T4モノクローナル抗体(---)もしくはエイズウイルスの前の抗T8モノクローナル抗体(---)にインキュベートした。洗浄後、フルオレセイン結合ウイルス抗体を加え、細胞を細胞蛍光定量法によって分析した。

各細胞系の蛍光ヒストグラム(細胞数対蛍光強度

らのポリ(A)⁺RNA 1マイクログラムと、大腸菌質からのポリ(A)⁺RNA 5マイクログラムとを1%アガロース・ホルムアルデヒドゲルを介して電気泳動にかけ、Hybond(Amersham)上にブロットし、³²P-標識T4cDNAインサート、pT4B(70)でプローブした。

3. マウスRNA試料のノーザンブロット分析、原因及び後継3T3細胞(細胞系細胞系)からのポリ(A)⁺RNA 5マイクログラムと、胸腺からの総RNA 20マイクログラムとを1%アガロース・ホルムアルデヒドゲルを介して電気泳動にかけ、Hybond上に移し、³²P-標識T4cDNAインサート、pT4B(70)でプローブした。

第18図: pT4BHF6のプラスミドマップ

プラスミドpT4BHF6は、T4のリーダー及び細胞外セグメントをコードするT4cDNAクローンpT4Bのbp 1-1257を含むpUC18誘導体である。このcT4 cDNAはSV40初期(early)プロモーターとウシ成長ホルモン遺伝子のポリアデニル化領域の間のTAA終結コドン(インサート)を含む合成リンカーとの間に挿入する。cT4発現カセットは、 β -グロブリンプロモーターとマウスdhfrコーディング配列とSV40ポリアデニル化領域とで構成されたマウスdhfr発現カセットに結合する。

50鑑定を行った。

A. 8日目にHIVに関して陽性を示した培養物対ウイルスイノキュラム希釈度のプロット。

B. 4日目の、8日目及び12日目のID-50(培養物の50%が陽性を示す時のウイルス希釈度の逆数)のプロット。

C. HIVの10⁻⁴希釈物を使用した場合の、8日目にHIVに関して陽性を示した培養物対種々のcT4濃度のプロット。

(以下空白)

第17図: 感染とストグラム(細胞数増殖速度)

cT4はT4⁺CEH細胞へのHIVの結合を阻止する。種17A(---)か、cT4と共に予めインキュベートし(---)か又は非形質転換DVB-22細胞(---)からの感染阻みと共に予めインキュベートしたHIVと共にインキュベートし、洗浄し、フルオレセイン結合抗HIV抗体し、細胞蛍光染色法によって分析した。蛍光強度(細胞数増殖速度)を示す。

第18図: cT4によるHIV感染性の阻害

HIVイノキュラムの感染性測定(15-50アッセイ)10倍ずつ希釈した一連のウイルスイノキュラムをインジケータ細胞(HTAで刺激したヒトリンパ球)と時間インキュベートする。次いで細胞を洗浄し、フルチャーでプレーティングする(培養当たり1×10⁴、系細胞当たり10の培養)。4日目、8日目及び12日目に培養アッセイによって上澄みを検出し、HIVを細胞の接種の30分前にHIV希釈物に加え且つ実験の培養地中に接種した9.0×10⁴のcT4を含む培養液(濃)最初の18時間のイノキュラムの後に導入したcT4を地(○)、あるいはcT4を含まない地(□)(対照)

発明の詳細

本発明は、ポリペプチドを含有するヒト免疫不全ウイルスエンベロープグリコプロテインと複合体を形成させる治療薬を提供する。本発明の1つの実施形態はポリペプチドのアミノ酸配列は、第6図に示した酸配列約+35)から約+369に結合したアミノ酸配列から約+185を含む。本発明の別の実施形態において、ポリペプチドのアミノ酸配列は、第6図に示したアミノ酸配列約+35)から約+369に結合したアミノ酸配列約+369+100を含む。本発明の更に別の実施形態におけるポリペプチドのアミノ酸配列は、第6図に示したアミノ酸配列約+369+100を含む。

更に本発明は、ヒト免疫不全ウイルスに感染した治療するための治療薬として有効な医薬的組成物である。この医薬的組成物は、ヒト免疫不全ウイルス

フュード糖蜜液または0.8%生理食塩水を含む。

更に本発明は、ヒト免疫不全ウイルスに感染した患者の治療方法を提供する。この方法は、患者に感染した免疫不全ウイルスをT4細胞に感染できないようにするために、患者に、臨時的に許容可能なキャリアと、ヒト免疫不全ウイルスエンベロープグリコプロテインと精合体を特異的に形成し得るかつ細胞に可溶性を示す本発明のアミノ酸配列とを含有する医薬的組成物を投与することからなる。

sT4タンパク質の*in vitro*生化学的及び免疫学的特性の特性化は、このタンパク質がAIDSの予防及び治療に価値があることを示した。研究によって、sT4タンパク質はウイルスの細胞外及び細胞から細胞への伝播の阻害剤として作用することが判った。培養において、sT4はウイルスがT4陽性細胞に結合するのを遮断することが判ったので、sT4を感染者に投与すると、ウイルスの細胞外伝播を阻害するように作用するであろうと考えられる。従ってsT4は、AIDS治療の予防薬及び治療薬の両方として価値がある。

予防薬としてのsT4は、この病気に対して高い感染性を有する個体、またはウイルスに対する抗体の存在によって

な治療は、ウイルス媒介の感染及び細胞から細胞への伝播を防止すべきである。更にsT4は、他の抗ウイルス剤、例えばアジドナミジン(AZT)と組み合わせて使用してもよい。

本発明のsT4タンパク質は、T4細胞増殖の阻害剤としての有効性も有する。多くの研究によって、免疫耐性、特に自己免疫疾患の発病及び進行並びに宿主特異的移植片拒否反応におけるCD4レセプタ(CD4はヒトT4レセプタ及び他の哺乳動物細胞におけるその胚芽特異性に対する一般用語である)の重要な役割が示された。sT4に特に関係するのは抗CD4 Mabを用いた観察である。これらのCD4レセプタとの結合によって、これらのMabの特定のものは自己免疫応答及び移植片拒否反応改善する。かかる作用の例としては、T細胞は*in vitro*増殖、例えば特定の抗CD4 Mabによる抗原誘導性増殖、リンホカイン分泌及びヘルパー細胞機能の障

AIDSに暴露されたことが判る個体に投与される。1期段階または症状が現れる前に有効量のsT4を投与しT4リンパ球のAIDS感染を阻害するように作用するとしては、AIDSに感染した人にsT4を投与すると、細胞外伝播を阻害するように作用する。

AIDS感染細胞と他のT4リンパ球との結合もまた伝播の経路であるらしい。更に結合は、感染細胞T4リンパ球増殖の損傷及び最終的にはT4リンパ球の一掃原因となり得る。細胞融合は、ウイルスエンベロープ遺伝子産物及びT4レセプタの両方に依存し、または類似のモノクローナル抗体(Mab)(120)によられ得る。sT4は細胞融合に干渉し、従ってウイルスから細胞への伝播及びT4リンパ球増殖の損失を減らすことが期待される。

T4レセプタは膜一連鎖であって、sT4は、全てのT4レセプタの表面ドメインを認識するウイルスの阻害剤であると思われる。

sT4は他の薬剤と組み合わせ、例えば逆転写阻害剤またはMabのごとき他のAIDSタンパク質阻害剤と共同して使用することができる。AIDSに対す

MabがCD4に結合した結晶の分子は阻害剤ではない。CD4とその配位子との結合を遮断することができる配位子はMHCクラスII抗原(121,122)における深溝であることが立証されている。しかしながら同じMabの少なくとも幾つかは、見掛けのクラスタリングによってCD4結合特性化を阻害する。

更にsT4は、恐らく、通常はT4レセプタの表面ドメインと相互作用する細胞外膜分子に結合すること、細胞の拒絶物質としてT細胞相互作用を阻害される。MabとsT4との区別は、重要な免疫学結果を示した。例えば、T4に対する幾つかのMabはT4細胞障害を引き出す一方、sT4は、MHCクラスII抗原を細胞において障害を引き出すことができる。またの特定クラスII配位子に対する感受性は、T4に対する親和性が高いのと比較すると極めて低いようで

の量及び割合は、血液中に微量量のsT4が結合されるように選択される。別の投与形態としてはsT4を透析剤として使用する体外投与がある。

更に本発明のsT4タンパク質は、T4細胞相互作用の治療薬または阻害剤として作用する天然、合成または組換え分子に対する試薬として使用することができる。

例えば、sT4タンパク質は、T4レセプタの細胞外ドメインと相互作用の拮抗物質を分析するための他の試薬と組み合わせて使用することができる。生化学的に種々な水溶性試薬を提供するための、ELISAに基づく方法によって測定されるタンパク質相互作用の分析といったふるい分け分析に使用することができる。例えば、sT4は317 aaのタンパク質又は119 aaのタンパク質を含有する複合物に結合するので、これは、ウイルス結合の阻害剤のふるい分けに使用することができる。sT4が119 aaのタンパク質を発現する細胞に結合することを示すELISAデータに基づき、sT4も、119 aaのウイルス感染細胞に対する選択的抗体分子として作用することができる。選択的抗体キャリアタンパク質として、sT4は、例えば、感染細胞に対する細胞障害剤の分配のためのキャリアタンパク質として作用することができる。

宿主は細菌細胞である。本発明の別の実施形態においては細菌細胞は*Escherichia coli*細胞である。本発明の更に別の実施形態においては宿主は真核細胞である。本発明の更に別の実施形態においては、真核細胞は哺乳動物細胞である。本発明の更に別の実施形態においては真核細胞は酵母細胞である。本発明の更に別の実施形態においては適当な宿主は昆虫細胞である。

更に本発明は、T4レセプタの予測される細胞外ドメインで構成されるsT4を産生する手段を提供する。T4 cDNAのT4レセプタのリーグドメイン及び細胞外ドメインをコードする部分、即ち前sT4を使用し、哺乳動物においてsT4を選択的発現(over-expression)できるベクターが構成される。1つのsT4の配列は以下の通りである。

更にT4レセプタが、T4細胞のクラス膜膜によって与えられるような試薬提供細胞におけるRBCクラス膜膜に選択的に結合することを示すデータに基づき、T4の選択的細胞相互作用の阻害剤をテストするために、クラスII抗体と組み合わせて使用することができる。その簡易分子との間の直接結合分析に基づいた上、sT4試薬に対する生化学的応答に依存するより分析を行なうことができる。

更に本発明は、そのアミノ酸配列が第6図に示したアミノ酸配列約+851から約+889に融合したアミノ酸配列約+3から約+185を含むポリペプチドをコードするベクターを提供する。本発明の別の実施形態においては、ベクターは、そのアミノ酸配列が第6図に示したアミノ酸配列約+851から約+889に融合したアミノ酸配列約+3から約+185を含むポリペプチドをコードする。本発明の別の実施形態においては、発現ベクターは、そのアミノ酸配列が第6図に示したアミノ酸配列約+3から約+185を含むポリペプチドをコードする。

更に本発明は、本発明の発現ベクターを含有する細胞を感染する。本発明の1つの実施形態においては

[illegible]

sT4用コーディング配列は、例えば公知のDNA配列を使用する遺伝子の合成、配列に基づく標準クローニング技術及びタンパク質の検知による同定、即ちcDNAクローンのT4発現細胞系からのトランスフェクション及びタンパク質に対する抗体による識別により得られる。sT4コーディング配列を造るcDNAクローンはオリゴヌクレオチドハイブリゼーションプローブの使用により識別される。プローブはT4タンパク質の公知の配列に基づき設計されている。sT4コーディング配列を造るクローンを検出したコーディング配列は制限エンドヌクレアーゼを使用して削除され

(excised)、クローニング及び/又は発現ベクターに挿入される。発現ベクターでは、sT4コーディング配列はコーディング配列の転写、翻訳及び処理に必要な又は所望される調節機能に有効に(operatively)結合されている。

調節機能は、例えば転写配列のポリアデニレーション及び増進のような他の要素と同様に、RNAポリメラーゼ結合及び転写に必要な機能を含んでいる。プロモーターは、例えば発現が好発細胞クローンの転写及び選択後まで誘発されないように調整される。本発明の発現に有効なプロモーターは例えばSV40初期プロモーター及びラウス肉種ウイルス

シコホルミシン(expression)耐性)阻害因子を含んでいる。

哺乳類の細胞での転写及び翻訳の後に、リーダー配列が脱落して現れ、成熟T4がならし培養内に生成される。

本発明の好ましい実施例では、sT4遺伝子は人間のB-cell又はマウスのジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)の遺伝子に結合されて発現ベクターを構築する。

sT4遺伝子は、例えば選択マーカー及びこれらの遺伝子とのコトランスフェクションを通じて遺伝子発現を選択的に増幅する手段を提供するために、人間のB-cell又はマウスのDHFRに結合されている。共通の選択マーカーは、例えば両種の遺伝子の単一コピーと同じように少ない組み込みのために選択するDHFR、G418又はハイグロマイシンを含んでいる。例えばDHFR系のメトトレサート(mtx)との増幅の結果、遺伝子が過剰発現する。

ス、モノニー肉種ウイルス又はサイトメガロウイルスのロングターミナルリピート(LTR)を含んでいる。

転写に先立ち、sT4遺伝子、即ちT4受容体の一と細胞外ドメインとをコードする遺伝子は、選択マーカー系を含むより大きいDNA分子内に組み込まが好ましい。選択マーカー系は、トランスフェクション細胞内に添加し得る表現型変化を容易に引き起こす遺伝子からなる。かかる表現型の変化は、例えばカス形成又は薬剤耐性であってもよい。このようにして例えばG418又はハイグロマイシンSに抵抗の遺伝子がある。又は、キサンタンガアニンホスホルトランスフェラーゼ(xspI)、チミジンキナーゼ及びガラクトキナーゼ(galK)のような他の選択マーカー。遺伝子増幅を可能とする選択マーカーは、トランスフェクション効率を増して、又は周囲の遺伝子及び基質の細胞内複製を増進させてコピー数を増大させる使用される。遺伝子のコピー数の増大にも役立つようなマーカーは、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(メトトレサート耐性)、C.A.D.(D-ホスホアンピシリン-レテート耐性)及びアデノシンデアミナーゼ(3-デ

的に結合することができ、又はこのような機能を有いこともできる。Hex)の米国特許第4,899,216号を

哺乳類細胞での遺伝子生成物の過剰発現は、一時は安定した手段により行われ得る。一時的な過剰発現クシニアウイルスベクターの使用のようなウイルス又はSV-40複製を支持する細胞内のSV-40ベースの使用するような遺伝子増幅方法により行うことができこれらの方法は最終的に細胞の死につながる。安定発現は、マルチプル遺伝子コピーの世代、例えば増殖周選択又はcellプロト-選択遺伝子の使用を可能とされる。

B-cell遺伝子系を使用するコトランスフェクションによるsT4タンパク質の過剰発現は、多くの異なる利便性を使用して行われ得る。好ましい細胞系は発現阻止し

増幅により行われるメトトレヤセートを含むBBFR(BDFR/HTX技術)を使用するとき、中国のハムスターの細胞の細胞系(CRO)が好ましい。特に、BBFRの欠如したCRO細胞が使用される(118)。使用し得る他の細胞の型は、例えばBBFRになるように変えられた胚の哺乳類の細胞を含んでいる。

あるBBFR細胞の型は、メトトレヤセートに対して正常BBFR(hxl, 米国特許第4,899,218号)ほど感受性のない変換変異BBFR遺伝子と組み合わせて使用し得る。一般に、BBFR細胞は正常BBFR遺伝子及び内細胞性選択可能遺伝子例えばG418耐性遺伝子(117)を使用し得る。トランスフェクションは標準技術を使用して実施する(118, 219)。これらの技術は、例えばリン脂カルシウム沈降、DEAE-デキストリン誘発ピノサイトシス、エレクトロポレーション及びウイルストランスフェクションを含んでいる。

トランスフェクションの後に、選択可能な遺伝子の増殖を可能とする条件下で、 α T4遺伝子を担う細胞を普通培地で培養する。胚の哺乳類細胞の培養基、例えばヒゴキサンテン及びチミジンがなく10%のウシ胎児血清を含むF12細胞(C18CO, グランドアイランド、ニューヨーク)を使用し得る。細胞培養は30-65℃の常圧で維持する。選択後

生き残り、また高レベルの α T4タンパク質を発生するは、更に培養を行うために選択される。このような選択的条件下で培養し、製品である α T4タンパク質として精製する。

本発明の実施例で使用し得る細胞培養方法は、若細胞の使用又は浮遊させた細胞の培養を含んでおし培地(CM)は浮遊させて又は固形支持体に付着させた細胞から採取することができる。即ち、CMで又は固形支持体で成長させ、また浮遊させて又は化した若しくはバックしたベッドで培養した培養液を得る。CMは選択したタンク容器の浮遊細胞から。

(以下全

本発明の α T4は、T4の細胞外ドメインの誘導体を含む。そのような誘導体は付加、欠失及び置換を含み、これらの変異はならし培養中へのタンパク質分泌及びタンパク質のBIV α 20タンパク質阻ち α 120への親和性に基いた影響を及ぼさない。例えば、1個または数個のアミノ酸を4位残基またはC末端に付加し、またはこれらの末端から除去し得る。あるいはまた、2個または数個のアミノ酸、好ましくは4個残基のアミノ酸を内部アミノ酸に挿入し、内部アミノ酸から除去し、または内部アミノ酸と置換し得る。他の場合には、 α T4とタンパク質キャリア、別の抗原または他の α T4分子との間にハイブリッドタンパク質阻ち誘導体形成してポリ α T4分子を実現することも可能である。更には、 α T4はキャリア分子に合成的に結合させ得る。

α T4誘導体の一例を後述の実施例に示す(変換例5参照)。 α T4のBIV α 20親和性は、既知の親和性を有する α T4分子を

ーダー及び/または細胞外ドメインのためのコーティングを操作することによって発現前に決定学的に得る。

本発明の α T4は使用済み培地から、様々なタンパク質技術、例えば親和性クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィーまたは逆流クロマトグラフィーで精製し得る。

α T4は通常の基質特異性殺菌剤、例えば脱水化合物シンドまたは核酸親和性リガンドを用いるか、また特異的に結合するリガンド、例えばモノクローナル抗体BIV α 20タンパク質もしくはその一部を用いてクロマトグラフィーで精製できる。

精製は例えば、(1)無血清選択成長培地で細胞を育てること、(2)ならし培地を澄清すること、及び

血清含有細胞から調製することも可能である。

sT4精製の好ましい一方法では、初めに増殖をイオン交換カラム、好ましくはS-Sepharose[®] (スルホアポビルセファローズ)カラムに通し、このカラムはsT4と結合する一方で大部分の汚染タンパク質を通過させる。次いで、緩衝液勾配を用いてタンパク質試料を溶離させる。第2のイオン交換カラムを用いる、好ましくはQ-Sepharose[®] (第四アミノエチルセファローズ)カラムであるこのカラムは、試料中に存在する汚染タンパク質が該カラムと結合し、一方sT4は結合せず、カラムを緩衝液希釈から回収されるような特性を有する。最後に、逆相汚染物質を除去するべく換能するゲル透過カラムを用いる。

sT4精製の別の方法では、sT4に対するモノクローナル抗体を用いる。sT4に対するモノクローナル抗体と結合する親和性ゲル支持体に接合した増殖を通過することにより、sT4タンパク質を1過作で精製できる。sT4は抗体結合部位でカラムに結合し、一方汚染タンパク質は出てカラムを通過する。その後、sT4をカラムから、sT4タンパク質の不活性化を防ぐ条件下に溶離する。

本発明は更に、ヒト免疫不全ウイルスエンベロープ様タ

ミから成るsT4は可溶性タンパク質として細胞表面物質中に分泌され、そのコンホメーションはレセプター-膜ドメインの表面を模倣するように見える。即ち、sT4は詳細な構造分析、特にX線結晶学に適合である。sT4断片、または他の相互作用分子との複合部形を成るsT4の三次元構造を決定することによって、sT4に関する選択的抗体物質及び作用物質の理論的設計のための基礎が提供される。

本発明の提供される様々なAIDS予兆及び免疫法は、ここに開示した新規なタンパク質、抗体及びDNA分子が特定分子との複合体またはハイブリッドを形成し、AIDSウイルスの中和に有効な免疫学的応答を再現する能力に基づく。本発明の分子、該分子の製造方法及びAIDS治療方法は、説明のために提示したもので特許の範囲名項に規定した本発明の範囲を全く限定しない次の実施及び変型例を参照することによって更に良く理解されよう。

ンパク質との複合体を特異的に形成し得る上述のうちのいずれかを製造する方法で、治療剤の製造をする適当条件下に本発明のホストベクター系を成すこと、及び製造した治療剤を回収することを含む方法を提供する。

sT4は、T4タンパク質または該タンパク質と相互作用する分子と検出する診断測定法に用いることができ、T4及びT4⁺細胞並びにT4に対する抗体の定量、治療において価値が有る。

sT4はまた新規な診断試薬、例えば標準的な免疫、即ちELISA、免疫イムノアッセイ、ラジオイムノアッセイのHs3または他の種類の分子の発現に用いること。sT4は、OKT4、OKT4A、及びT4レセプターの他のヒトゲノムのほとんどかまたは全てを示すので、T4レベルの絶対的定量に適用できる免疫診断測定法に有用である。現在、T4レセプター定量のための基準

T4レセプターは、三つの異なる化学的環境、即ち永性細胞表面、浮水性膜、及び溶血性水溶性細胞質に在る。これらの異なる環境がレセプターの、その完全状態での機能を防止すると考えられる。細胞死ドメ

材料および方法

組織由来抗体

Ticoll Hypaque密度勾配离心分離によって単離した血液はヒツジ赤血球溶血ロゼット陽性(E⁺)を調このE⁺集団内のT4⁺サブセットとT8⁺サブセット-T8抗体と、アフィニティー低型ウサギ抗マウスIgGに結合したヒト赤血球を用いたT8抗腫細胞のよって単離した。これらのサブセットをサイトフルーで分析したところ、T4⁺細胞はT4⁺が95%、%で、T8⁺細胞はT8⁺が95%、T4⁺が2%で示された。

Fre 2.2 Tセルライン(T3⁺、T4⁺、T8⁺)は、未分化型赤血球内の人赤血球から得たT3⁺、T4⁺、T8⁺、T11⁺であり、R P1 T3⁺、T4⁺、T8⁺、T11⁺である。01-Cl14は赤血球内であり、T3⁺、T4⁺、T8⁺、T

記載されている(28)ようにして得た。

アフィニティー精製したウサギ抗マウス IgG は塩化クロム塩(24)によってヒト赤血球に結合した。

1. 細胞と NIH 3T3 細胞の同時培養法

ネズミ L¹k⁺ 3T3 細胞は、10% ウシ血清 (Gibco) と 50 ㎍/ml ジアミノプリン (DAP) を補充した Dulbecco 液 (agle) 培地 (DME) 中に維持した。L 細胞を、培養後換の 1 日前に 10cm の皿に 5×10^4 の細胞密度でプレートアウトした。リン酸カルシウム沈着液は、Higler (26) によって改変された Graham と van der Eb の方法 (25) により、四喜たり 100 ng の DTX と 20 ㎍の高分子量 T 細胞または L 細胞 DNA を用いて調製した。次の日、L 細胞を 10% ウシ血清、15 ㎍/ml ヒポチンチン、1 ㎍/ml アミノプテリンおよび 5 ㎍/ml チヌファンを含む DME (HAT 培地 (27)) 中で選択下に配置した。L¹ 変異株は、12~14 日の HAT 選択の後ロゼットアッセイを用いてスクリーニングした。

ネズミ NIH 3T3 細胞は、10% 新生ウシ血清 (Gibco) を補充した DME 中に維持した。NIH 3T3 細胞を、培養後換の 2 日前に 10cm の皿に 5×10^4 の細胞密度でプレートアウトした。これらの細胞に、10 ㎍のキャリアー DNA をらびに 10 ㎍の 16-mHVE (1/

5×10^4) を適量に希釈した OKT[®] 4、OKT[®] 8 またはコントロール抗体と共にチューブに入れた。この期間、抗体適合性を 4℃ で 45 分間インキュベートした後 cytowash で二回洗った。細胞にフルオレセインイソシアネート (FITC) 結合ヤギ抗マウス IgG + A + M (Cappel) を加え、4℃ で 1 時間インキュベートした。次いで、細胞を cytowash 中で三回洗い、0.91% ナトリウムアクトを含む PBS 0.5 ㎖ 中に再懸濁した。この細胞を Becton Dickinson FACS IV セルソーターで分析し、データをためて VAX 11/780 コンピューター (Digital Equipment Co.) を用いてプロットした。

RNA と DNA の抽出

細胞を 4 M チオシアン酸グアニジウム中でホモゲネーションして全 RNA を抽出した後、5.7 M の CsCl 溶液を通して密度心した (28)。オリゴ (dT)、セルロースクロマトグラフィー (Yon 3, Collaborative Research) (29) によってポリ

hco または 10 ㎍の T4-pVco37 および 500 ng の pSV1 リン酸カルシウム沈着液を適用した。2 日後、を 10% ウシ血清と 500 ㎍/ml の G418 (Geneticin) の DME 中で選択下に配置した。選択期培地中で 1 日後に生じるコロニーに対してロゼットアッセイロゼットアッセイ

プレートとリン酸カルシウム沈着液 (PBS) 日後、そのプレートを、5% ウシ血清培地を含有 1/500 に希釈した精製モノクローナル抗体 OKT 2.5 と共に密度で 45 分間インキュベートした。を PBS で三回洗やかにすすいで遊離の抗体を終ったウサギ抗マウス IgG 抗体に結合したヒト赤血トック懸濁液、PBS / 5% ウシ血清培地中で 1/500 を加え、そのプレートを空盤に依着した。45 分後性コロニーの検査に先立って遊離の赤血球を PBS を加えた。

サイトフルオロメトリー分析

培養細胞を PBS 中の 0.005 M の EDTA、0.5% ウシ血清アルブミン (BSA) と 0.01% ナトリウムシトキシ (cytowash) を含有する PBS で一洗った。9.

の cDNA を合成した (23)。EcoRI メチラーゼポリメラーゼで消化した後、二本鎖の cDNA リンカーを用いて λ gt10 (30) の EcoRI 部位にクした。Charon 4 ヒトゲノムライブラリーは、Yon (Harvard University) (31) から買入に分ちして一部を剪取った cDNA プロブの作成

Davis (32) により記載されているようにして。抗体 L¹D-4 から得たポリ (A)⁺ RNA から得た cDNA を合成した。この cDNA を遊離の細胞のポリ (A)⁺ RNA (ロット=3000) に対して、ヒト cDNA にランダム本質の配列アパタイトクロマトグラフィー (32) によって遊離部を欠く (subtracted) cDNA プロブをフィリダイゼーションにかける前に 50c-ブタノールで平衡化した G-50 Sephadex カラムで懸濁した。

および5×SSC中で42℃で行なった。このcDNAライブラリーのスクリーニングにおいて、137 μニトロセルロースフィルター当たり 6×10^4 cphs の一倍を欠くプローブを用いた。ゲノムライブラリーから得たフィルターをニック翻訳した(34) cDNA挿入物にハイブリダイズした。68℃で洗滌し、最後に $0.2 \times SSC$ で洗滌した。増感スクリーンを存在させて-70℃で1~2日オートラジオグラフィにかけた。

DNA配列決定

pt48の制限断片をM13ベクター-m18およびm19(35)中にサブクローン化した。配列決定反応はジデオキシエインターミネーション法(36)を用いて行なった。配列決定の方策(strategy)を第3図に示す。

SouthernおよびNorthernブロットハイブリダイゼーション

高分子量の制限DNAを、製造業者(Boehringer Mannheim)の推奨するところに従ってDNA1は当たり5μ位の制限ヌクレアーゼで消化した。サンプル(10μ)を0.8%アガロースゲル上で電気泳動にかけた。DNA断片をGene Screen (New England Nuclear)(37)に移し、ChurchとGilbert(38)により記載されているようにしてハイブリダイズした。

RNAを0.8%アガロース・ホルムアルデヒドゲル(39)上に

ルメチルスルホニルフルオリド(6000)を含む10mMのTris(pH 7.4)、150 mMのNaClと(TBS)中に可溶化した。寄附物を $100,000 \times g$ で1時間遠心し、上清をHodoS(42)の手順に従ってレンズ目レクチンクロマトグラフィー(Pharmacia)にかけた。細胞液を、コントロールのマウス腎水およびプロテインA-セファローズ(Pharmacia)の混合液を用いて一回4℃で1両滴、そしてプロテインA-セファローズだけを用いて二回4℃で1時間ろ過吸着させた。次に、各上清のうち 2.5×10^4 cphs を10μlのモノクローナル抗体(約1μl/滴)およびプロテインA-セファローズと混合し、ターンテーブル上で4℃で一晩インキュベートした。次いで、ビーズを0.5%のNP-40と0.2%のSDSを含む冷TBSで四回洗い、電気泳動サンプルバッファー中に再度懸濁した。

ゲル電気泳動

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動はLaemmli(43)の手法に従って実施した。最終試料物とin vitro翻訳産物を2-メ

チル、GeneScreenに移した。Northernハイブリダイズは製造業者の提供する手順に従って実施した。SouthernとNorthernブロットラニック翻訳したプローブにイズした。

SP6 RNAの合成およびin vitro翻訳

klのT4 cDNAをpSP65(Proscript biolac)のEにサブクローン化し、Hind IIIで線状化した。放射同位体標記クレオチドを存在させずにBPBポリメラーゼを化したプラスミドDNA(1μ)を転写するには発酵の通りにしたが、転写バッファーにはGTPと未標記を添加した。反応混合物の1/10を、L-[^{32}S]-Apercha(44)と1μlのS-アデノシルメチオニンを左系(Mediate Research Laboratories)で翻訳し、in vitro翻訳産物を下記の還元条件下でSDS-ポリリド電気泳動にかけた。

細胞培養、レクチンクロマトグラフィーおよび免疫

既に記載(41)されているようにして、10%の透析液と1 mCiのL-[^{32}S]-メチオニン(Apercha)メチオニンを含まないDMEM培地中で12時間細胞をこの細胞を、0.5%Nonidet P-40(Shell)および0.

細胞免疫反応およびロゼットアッセイ

マウスφ-2細胞(44)に、10%ウシ血清(CS)に汚したBulboccoの免疫液(45)培地(DME)中にφ-2細胞は、培養乾燥の2日前に10cmの皿当たり5×10⁶細胞でプレートアウトした。リン酸カルシウムMigler(27)によって改良されたGrahamとvan Et(28)によって調整した。10μlのキャリアーDNAを14-3897または10μlのT6-pHVIを用いて試料物を加えた。2日後、これらの細胞をDMEM/10%CSとSG413(Geneticin[®], Gibco)中で選択下に配製した。

T_4^+ 又は T_8^+ コロニーを調定するための Rosetting アッセイは、特定細胞中での生育から2週間後生存コロニーで実施した。リン緩衝食塩液 (PBS) を用いて1回リンスした後、プレートを5%ウシ胎児血清 (FCS) 含有PBS中で1/500希釈した精製モノクローナル抗体OKT[®] 4A又はOKT[®] 8 (1 μ g/ml; Ciba) 2.5 mlと一緒に室温で45分間インキュベートした。プレートをPBS中で3回やさしくリンスして、遊離の抗体を除去した。精製ウサギ抗マウスIgG抗体 (2% v/v ストック懸濁液、PBS/5% FCS中で1/10希釈) を混合したヒト赤血球を添加し、プレートを室温で放置した。15分後、遊離の赤血球をゆっくり吸引し、検査の前にPBSを添加した。 T_4^+ 及び T_8^+ ϕ -2クローンをコロニー単離により精製し、その特性をフローサイトメトリー及びノーザンブロット分析により調べた。

感染性レトロウィルスの産生及び感染

10^5 c.f.u./mlの力価を有する組換えレトロウィルスストックを産生する T_4^+ 又は T_8^+ ϕ -2クローンを精製した。ウィルスストックを、 T_4^+ 又は T_8^+ ϕ -2クローンの近接細胞 (near confluent) 培養に新鮮なDMEM/10% C S 10mlを添加

後、H e L o 細胞では1 μ g/ml、原細胞細胞については0.5 μ g/mlとした。組換え両性ウィルス (4-8 μ l) を産生する全ての細胞培養物を23℃培養条件下で保持した。

AIDS ウィルス

H T L V - III / L A V のプロトタイプ L A V 菌株を J. C. Cherman (Institut Pasteur, Paris : (16)) から入手した。本研究で用いたウィルス株は、我々の実験室の第2-第5世代ウィルス由来のものであった。株は、H T L V - III / L A V - 感染性細胞培養液 (P H A) - 刺激未精白液 (高濃度 (300 \times g で7分間遠心した後 1500 \times g で20分間遠心) により集めた) の培養上清であり、液体培養中で保存した。結合研究のために、ウィルスを、上記の如く 90,000 \times g で90分間の超遠心により集めた培養上清から 6.91M Tris, 0.15M NaCl, 2 mM EDTA, pH8.0 中の Renograffin (E. R. Squibb) 15% クッションを用いて濃縮した。

ϕ -2 T_4^+ T_8^+ III / L A V 株

して作成した。24時間後、細胞を取り除き、0.45 μ (Millipore) を用いて濾過した。感染のために細胞を、8 μ g/ml polybrene (Aldrich) の存在下上清 (又は稀釈液) 2 mlと一緒にインキュベートした後、新鮮な細胞3 mlを添加した。感染から3日後、 μ g/ml G418 含有DMEM/10% C S に移植し、育させ、G418「コロニー」を計数し、*leu* ⁻ *select* rose はフローサイトメトリーを用いて両面 T_4^+ 又は T_8^+ で調べた。

ϕ -2培養上清を用いて、上記したマウス ϕ -A 換した。 T_4^+ 又は T_8^+ 粘着トランスフォーマー *leu* ⁻ *select* *rosette* アッセイ後コロニー単離により精製 T_4^+ 又は T_8^+ 非粘着性トランスフォーマントをセンス細胞ソーティング (FACS) により精製細胞ヒトリンパ球細胞系 (H S B.2, R P M 1 - Raji - B 細胞) 及び粘着性上皮細胞 (H e L o) を T_8^+ ϕ -A 株クローン (10 μ g/ml マイトマイ 2時間予照射、Sigma) と共培養して感染させ、細胞系を1.5 μ g/mlの濃度でのG418 耐性につい

て特性を調べた。1 \times G 分離の一部を、上記した 90,000 \times g フルオレセインソチオシアネート (P I T) 染料 (質比=10.1 μ g/ml)、ホースラディッシュペーゼ (H P O、タイプ VI、Sigma) 及びアガロプリングさせた。非免疫血清からのIgG 複合体も成した。

逆転写トランスクリプターゼアッセイ

Mg 依存の逆転写トランスクリプターゼ (RT) 1.5 μ M Mg²⁺ (52) の存在下で (A) _n (dT) ₁₂ コントロールとして () _n (dT) ₁₂₋₁₆ の時一を用いて測定した。

細胞質AIDS ウィルスの検出抗体検出

培養細胞 (0.1 ml $\times 10^5$) をガラススライド (Shandon cytocentrifuge)、95% ニタニール-5 20℃で30分間固定し、PBS (0.01M PO₄, 0.1 NaCl, pH8.0) を用いて10分間3回洗浄した。

リップの下に設置した。690 mWの紫外線のLight
criboplan 顕微鏡で、スライドを撮写した。これらの条件下で、
F1T2C-抗H TLV-III/LAV抗体はH TLV-III/LAV
に対して特異である。非感染のP HA細胞膜脂、Epstein Barr
(EB) ウイルス感染B細胞系、アデノウイルス-系細胞系、
T細胞系並びにH TLV-I及びH TLV-II感染細胞系は染
色されなかった。

D A1感染ウイルス免疫アッセイ (抗原捕捉アッセイ)

感染H TLV-III/LAVの力価測定のための微小培養ア
ッセイは(47)に記載されている。要略的には、P HA-細胞リン
パ母又は細胞系 (2×10^5 細胞/ml) をウイルス接種物の濃度
10倍希釈により接種し、37℃で18時間インキュベートした。次
いで、細胞を洗浄し、微小培養物 (希釈あたり18~20カルチャ ;
0.25ml培養中のカルチャあたり 1×10^5 細胞) 中にプレートし
た。4日毎に、上清100 μ l を取り除き、新鮮な培養地を取り換
えた。次いで、上清を、上記した如き抗原捕捉アッセイにより
ウイルス検出についてアッセイした。感染ウイルス株 (LD-
50) は、培養物の50%がウイルスに対して陽性を示す希釈のレ
プロカルとして定義される。

(54)に記載されている如く細胞を予処理してから30分後シェ
ードタイプを添加することによりシェードタイプブランクの形成
を抑制した。

シンシチウム誘発アッセイ

2×10^5 細胞を、直径16mmのウェルにおいてH TLV-III
(55)により感染かつH TLV-IIIを産生する 2×10^4 H9細胞
と一緒に培養した。培養物を37℃でインキュベートし、病記
した如く(51,56) 18時間後にシンシチウム形成について調べた。
5倍もしくはそれ以上のシンシチウムを含む細胞を正と判定し
た。接種時に混合培養物に抗-T₄モノクローナル抗体 (1:
10) を添加してシンシチウム抑制を調べた。

細胞けい光分析及びA1D8ウイルス検査

方法は(46)に記載されている。要略的には、フルオレセイン
結合抗-T₄又は抗T₈モノクローナル抗体 (OKT[®] 4A,
OKT[®] 8) を用いる直接けい光抗体法により、細胞表面T₄
又はT₈を抽出した。密着/洗浄バッファは、0.1%牛血

VSVシェードタイプアッセイ

水疱性口炎ウイルス (VSV, Endiana 菌株、野矢製)
上記した如く(53)エンベロープシェードタイプに必要なレ
ウイルスを感染する細胞中で増殖させた。高感度免疫の中性
抗-VSV血清を調めたVSVに感化して、非シェードタ
ウイルス粒子を不感化した。シェードタイプは $10^4 \sim 10^5$
PFU/mlの範囲であった。アッセイのために、VSVシェ
ードタイプで感染させるべき 2×10^5 細胞を直径80mmの組織
ウェルに導入した。H9L9、N1H3等3及びL細胞は
粘着性であり、細胞タイプの細胞は下層を50 μ g/mlのダ
ミーリンを用いて予処理することにより付着した。1時
ウイルスを吸着させた後細胞を洗浄し、各ウェルに 10^5 ミン
CCL64又は牛ND SK細胞を添加した。これらの細胞は
VSV感染のための優れたブランクを提供するが、シェ
イプビリオンによる感染に対しては耐性を有している。ブ
ランク細胞を固定、拡散させた後(約30分)、染色を希釈
で扱った。感染後2日目、VSVブランクをカウントし
抗-T₄ Aモノクローナル抗体 (1:20)、抗-H TLV
血清 (1:10) 又は抗-H TLV-I血清 (1:10) を使

(5×10^5) をモノクローナル抗体希釈液25 μ l 中4℃で
18時間インキュベートした。細胞を遠心 (800 $\times g$ で7分間)
り洗浄し、免疫液中1%パラホルムアルデヒド0.5 ml中に
浸し、フルオレセイン結合セルソーク (FACS IV, Bect
Dickinson) を用いて分析した。H TLV-III/LAV株
のために、 5×10^5 細胞をH TLV-III/LAV (10 μ l 中
と一緒に37℃で30分間インキュベートした。洗浄した細胞
フルオレセイン結合抗-H TLV-III/LAV (10 μ l 中に4
30分間処理させた。細胞を洗浄し、1%パラホルムアル
ド中に再懸濁し、上記した如くFACSについてアッセイ
H TLV-III/LAV 結合の抑制のために、細胞を抗-T₄
又はT₈ (10 μ l 中10 μ g) と一緒に4℃で20分間予備
インキュベートした後H TLV-III/LAV (10 μ l 中500 μ g
37℃で20分間に再び添加した。細胞を洗浄し、フルオレセ
イン結合抗-H TLV-III/LAVと一緒にインキュベートし
洗浄し、パラホルムアルデヒドに再懸濁し、上記した如く9

ベルオキシダーゼ注(18)により脱脂ヨウ素化した
(radio iodinated), 4×10^7 細胞を0.5mM EDTA、
2mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 及び20 μg のラクトベルオキシダーゼを含
むPBS 1ml中に懸濁した。0, 1, 5, 10及び15分間に0.10
% H_2O_2 10 μl を添加した。反応を24℃で実施し、10 mM
NaIを含むPBS 50容量中で2回遠心することにより20分
間に反応を停止させた。細胞懸液を4本のチューブに分け、
HTLV-III/LAV (20 μg 中2 μg)と一緒に37℃で30分
間インキュベートした。続いて、0~4℃で沈し、検査した。
洗浄した細胞を、洗浄緩液バッファ(LB; 0.2Mフェニルエ
チルサルホニルフルオライド、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アプロチニン、
~~0.2Mフェニルエチルサルホニルフルオライド、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アプロチ~~
~~ニルフルオライド、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アプロチ~~
0.2M EGTA、0.2M NaF、0.2 %デオ
キシコール酸ナトリウム及び0.5 % (v/v) Nonidet P-40含有
0.02M Tris、0.12M NaCl、pH 8.6) 1mlを添加して溶
解させた。チューブを氷上で15分間保持し、8000 $\times g$ で20分間
遠心して核を除去した。

吸収装置に、ヒト抗HTLV-III/LAV IgG、ヒト
非免疫IgG、抗 T_4 A及び抗 T_8 抗体のセファコース結合物

(conjugate)を懸液のようにして懸濁した(48)。
(lysate)を凍結下1.5時間、200 μl のセファ
ロース結合物(上記のもの)を用いて免疫セ
ファコース吸収物を、LBで1回、0.5M NaI
LBで1回、そして0.1 %のドデシル硫酸ナトリ
を含むLBで1回の合計3回洗浄した。吸収物質1
分間、20 μl のサンプルバッファ(0.01Mトリ
3% SDS、5% 2-メルカプトエタノール(v/v)
プロキフェノールブルー及び10%のグリセリン(v/v)
により溶解した。電気泳動は、8.8~20%のグラ
3%の結合ゲルを含むポリアクリルアミドゲルで
トラジオグラフはコダックXAN-5フィルムを用
いた。

ウイルス阻害アッセイ

2×10^5 T_4^+ T_8^+ T細胞を0分にニイズウ
した。阻害剤である塩化アンモニウム(20 mM)ア
ニン(aminoguanidine)(20mM)を、ウイルス感染の
(0分、30分、及び60分)加えた。6時間後、細胞

新鮮な培養(RPMI/10% FCS)で置換した。エイズ感染
におけるこれらの阻害剤の作用を感染5日後に評価した。ウイル
ス抗原を発現する培養物中の感染細胞のフラクションを、上記
のように免疫ゲイ分析法によって測定した(35)。

RNA抽出及びノーザンブロットハイブリダイゼーション

全RNAを細胞から、4Mのグアニジンチオシアネートに中
にリナイズし、その後5.7M CsClグレーションを介して澄
清化して分離した(18)。ポリ(A)⁺セレクションは、オリゴ
(dT)-セルコースクロマトグラフィー(タイプ3、コラ
レーティブリサーチ(Collaborative Research))によって行な
った(29)。RNAを1%ブカロースホルムアルデヒドゲル
(39)上で電気泳動し、ハイバンD(Amerham)上に移した。ノー
ザンブロットハイブリダイゼーションを製造者からもたらされ
た方法に従って行なった。プローブを $\alpha^{32}\text{P}$ ラベルデオキシネ
クレオチドトリホスフェートで比活性 $0.5 \sim 2 \times 10^5$ cpm/微
量塩にニックトランスレート(nick translate)した(39)。

T_4^+ を発現するT細胞形質転換体を構築することを
 T_4^+ 形質転換フィロプラスト(線粒体細胞)の
ら合成されたcDNAを消去的ハイブリダイゼー
ン縮し、外縁のTリンカサイトのmRNAから作
ライブラリーから T_4^+ をコードするcDNAを単離
プローブとして用いた。 T_4^+ cDNAクローンの
ノーザン及びサザンブロット分析法により、そして
これらのクローンが T_4^+ フェノタイプをレベ
移す能力により決定した。同様の手続は、先に、T
をコードしている遺伝子を単離するために用いら
タミジキナーゼ(1k)欠損マウス細胞を、
プラスミド、pTK(25, 26)に拘ってT細胞由来
HTLV-IIIからゲノムcDNAと共に形質転換
した。T細胞の表面タンパクを免疫する: K^4 細胞
は、系内でのロゼティング(resetting)分析に
た。 K^4 クローンをT₄に対するマウスモノク

1つの一次 T_H^+ 形質転換体、LTD-4を得た。このクローンによる T_H^+ 分子の発現は、サイトフルオロメトリック(cytofluorometric)分析により、独立に確立した(第1図)。

T_H^+ 形質転換体、LTD-4のmRNA分布は、新たに形質転換された遺伝子の発現に依りてのみ、非形質転換L細胞のそれと異なるはずである。これらのシーケンスは、非形質転換細胞(32, 86)からの大過剰のRNAと共に T_H^+ 形質転換体のポリ(A)⁺RNAから調製された高濃度ラジオアクティブなcDNAをアニールすることにより選別される。高ボット(Rot)速においてするハイブリダイズできないcDNAをヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーにより単離し、 λ embl2クローニングベクターgt10中で播種されると外縁T細胞cDNAライブラリーをスクリーニングするのに用いた。4つの弱いハイブリダイズプラーク(hybridizing plaque)が固定され、プラーク精製され、 T_H^+ シーケンスの存在について分析された。

これらのクローンのどれが T_H^+ をコードするか決定するためには、 T_H^+ と T_H^- 外縁(peripheral)T細胞、白血球細胞、脾細胞、L細胞形質転換体及び非リンホイド(nonlymphoid)細胞を用いて、ノーザンブロット分析を最初に行なった(第2

図)。4つのクローンのうち1つは、 T_H^+ 細胞中のみするRNAにハイブリダイズした。このクローンは T_H^+ 形質転換体、LTD-4中に存在する3kb RNAを決定し、 T_H^+ 外縁リンパサイト、多量の T_H^+ 白血病細胞ライン及び脾細胞のポピュレーション中に存在する。非形質転換プロプラスト、 T_H^- 外縁リンパ細胞、W cell細胞、あるいはトニロープラストーマ(neuroblastoma)細胞からのRNAではハイブリダイゼーションは認められなかった。このクローンによりは知られるRNAの発現パターンは、 T_H^+ をコードしている可能性と一致する。しかしながらこのcDNAは単に0.6kbの長さであり、3kb mRNAにハイブリダイズする。従って、ヒト外縁T細胞cDNAライブラリーを再スクリーニングし、3kbインサートを含む1つのクローン(pTD9)が得られ、このものはサイズの成熟した(nature)メッセンジャーRNAに近似していた。このクローンの制限地図(restriction map)を第3A図及び第3B図

図)。4つのクローンのうち1つは、 T_H^+ 細胞中のみするRNAにハイブリダイズした。このクローンは T_H^+ 形質転換体、LTD-4中に存在する3kb RNAを決定し、 T_H^+ 外縁リンパサイト、多量の T_H^+ 白血病細胞ライン及び脾細胞のポピュレーション中に存在する。非形質転換プロプラスト、 T_H^- 外縁リンパ細胞、W cell細胞、あるいはトニロープラストーマ(neuroblastoma)細胞からのRNAではハイブリダイゼーションは認められなかった。

このクローンによりは知られるRNAの発現パターンは、 T_H^+ をコードしている可能性と一致する。しかしながらこのcDNAは単に0.6kbの長さであり、3kb mRNAにハイブリダイズする。従って、ヒト外縁T細胞cDNAライブラリーを再スクリーニングし、3kbインサートを含む1つのクローン(pTD9)が得られ、このものはサイズの成熟した(nature)メッセンジャーRNAに近似していた。このクローンの制限地図(restriction map)を第3A図及び第3B図

ゲノムプロット分析

サザンブロット実験(33)を次に行ない、単離したcDNA

単離したcDNAが T_H^+ をコードすることは、さらにこのクローンが形質転換後、脾細胞を T_H^+ フェノタイプ換しうるかどうかによって実証される。染色体DNA中の遺伝子は大きく、さらにいくつかのゲノムクローンにスパン(span)する。従って、cDNAクローンを2つのレトロウイルス発現ベクター、pVcos 7およびpMV6k1/neoに導入する。これらのベクターは、単一のEcoRIクローニング位点の間にあるセロニーマウス白血病ウィルスの強い左端リト(LTR)を含んでいる。5'-LTRはクローニング位点を過して転写を促進し、3'-LTRは開裂及びポリニレーションに必要なシーケンスを含む。ベクターpMV6k1/neoはまた、ネオマイシンホスフォートランスフェラーゼのコード領域に融合した1kプロモーターを含んでいる。pVcos 7を用いる構築物(construct)は非結合選択可一カーと共に形質転換することを必要とする。一方、pMV6k1/neoは、結合(binding)共形質転換を許容するネオマイ

出するロゼット法を用いてスクリーニングした。

pVcos 7 で得られた G418 コロニーの約 50% 及び pMV61k / neo で得られたコロニーの 15% がこのアッセイで T_4 について陽性であった。ロゼット陽性コロニーをさらにサイトフルオメトリーで分析して、 T_4 が形質転換細胞の表面で発現されていることを確認した (第 1 図)。

代謝タンパクラベル実験を行い、 T_4 形質転換細胞及び T リンパ細胞が同一の分子量の T_4 タンパクを発現することを明らかにした。非形質転換 NIH 3T3 細胞、 T_4 形質転換体及び T リンパ細胞を $1 - [^{35}S] -$ メチオニンの存在下に 32 時間ラベルした (41)。これらの細胞を洗剤で可溶化し、溶媒物 (lysate) をレンズ豆レクチンカラムに通して糖タンパクを精製した (42)。結合糖タンパクフラクションを溶離し、 T_4 に対するモノクローナル抗体で免疫析出 (immunoprecipitate) させた (第 2 図)。還元条件下、相対分子量 51kd で移動する糖タンパクを、T リンパ細胞と 2 つの独立した T_4 形質転換体からの抽出物中で検出する。このタンパクはコントロールである 3T3 腫瘍細胞中では検出されない。非還元条件下では、51kd 糖タンパクが、T 細胞中及び形質転換細胞系群中では

T_4 により免疫検出される。

これらの実験から、形質転換体が抗 T_4 により 55kd 糖タンパクを発現し、このものはサイズの異なる変種で発現されるものと同一であることが明かされて、 T_4 cDNA を用いるノーザン及びサザンに T_4 フェノタイプをマウス免疫性 T 細胞の cDNA の能力の両者の結果は、T 細胞変種々全てのコードリークエンスがクローニングされたこと。

3. cDNA のヌクレオチド及び糖タンパクシ

T_4 コード領域の完全ヌクレオチドリークエンスを終止法 (termination method) を用いて、3 kb サイト 100 万のストランドをシーケンシングすることした (35, 38)。完全ヌクレオチドシーケンス及びリークエンスを第 3 図に示す。最後のオープンフレームは、開始コンセンサスリークエンス PurNNAT で取り囲まれたメチオニンコドンを持つものである (38)。この読み取りフレーム (reading frame) は、オチドに及び、133 アミノ酸を含むポリペプチド

である。この読み取りフレームの広がり、この cDNA を RNA 免疫ベクター pSP69 にインサートすることにより確認した (43)。このベクターから合成した RNA は、生体外で翻訳された場合、非修飾 (unmodified) 51kd タンパク (ヌクレオチドシーケンスから予測された正確な分子量) の合成を支配する (第 7 図)。

(以下 5 行)

T_4 は、リーダー配列、4 つのアンテナ可変領域、及び抗体鎖領域から成り、各部分は免疫遺伝子 (62, 63) の異なる遺伝子メンバーとの対応関係性を有している (第 6 及び 8 図参照)。Hydrophobicity プロットにより予測されるリーダーペプチド水溶性残基の一群 (stretch) は、開始コドンの直後にある。天然 T_4 タンパクがプロセス処理されるように設計することができないが、既知の翻訳パターン (64-1 位置のヌレオニンの直後で開始が生じるもの) である。従って、シグナルペプチドは 28 個のアミノ酸であり、プロセス処理された T_4 は 485 個の残基から成る。

成熟タンパクの 1-24 残基部分は、イムノグロブリン鎖領域とアミノ酸及び糖基上の相同性を有している。このイムノグロブリン可変領域はこの領域との全体的な

第3

度と距離はイムノグロブリン鎖及び隣接分子に見出される対応部分に類似している(67)。これらのシステインはV領域に典型的に保存されている鎖間のジスルフィド結合を形成することができる。この予想は、還元条件下よりも非還元条件下の方が T_H の移動速度が大きいこと、これは少なくとも1つの鎖間結合が形成されていることを意味する、という我々の経験結果によって、支持されるものである(第5図、レーンc及びf)。

個々のアミノ酸レベルに於ける相関性以外にも、 T_H のV領域はイムノグロブリン可変領域と構造的特徴を共有するものである。イムノグロブリンの可変及び不変領域は、連続する塩基対が折りたたまれ2つの β -シートを形成するという特徴的なパターンで折りたたまれている(61,68)。これらの β -シートは、ジスルフィド結合及び静電的水素結合相互作用の両者によって、一緒にになっている。 T_H のV領域がイムノグロブリン鎖のV領域と2次構造上でどのような相関を有しているかを決定するために、二次元構造アライメントを行った。同時に、これらの配列における予想可能な β -シート及び β -ターンプロットもChou及びFasanoの経験的に導かれたアルゴリズムを用いて行った。これらの分析によって、 T_H のV

続いて、統計的に重要な配列であってイムノグロブリンV領域のポリペプチドに構造的相関性を有する、3つの側面VJ接領域に構造的に分けることができる265個のアミノ酸配列がある。第6及び8図参照。更に、この領域には、N-結合型グリコシル化部位が二つ存在する可能性がある(Amino-Leu-Tyr; 第6図)。

細胞外領域に於いて、疎水性プロット(64)による予想で可能性のある膜通過(膜通過)配列があり、この配列は、疎水性及び中位アミノ酸残基のみを含むものである。このセグメントは、Ⅱ型主要組織適合抗原タンパクの β 鎖の膜通過エクソンと極めて相関性が高い(第9図)。これらの配列を並べて比較すると、ギャップなしに89%の相関性が認められる。この膜通過セグメントに於いて、40個の高電位アミノ酸が細胞外領域を構成する(第6及び8図)。

T_H 遺伝子：発色体位置及びイントロン-エクソン位置

マウスH-2D^bにおいて、そのマウスH-2D^bは細胞ハイブリ

細胞内に存在する2つの β 鎖の存在はイムノグロブリン領域内に見出される対応領域と非常に良く一致していることである。第9図参照。 T_H の保存された2つのシステインは β 鎖及びF内にあり、イムノグロブリンの保存ジスルフィド結合を形成することが知られているV領域内のシステインの位置と一致する。第1のシステインの12個アミノ酸分下流に1プロファンがあり、第2のシステインの2個アミノ酸分下流にチロシンが位置する。これらの残基は、鎖V領域の β 鎖及びFに夫々非常に特徴的なものである。更に、アスパラギン残基が第2のシステインの6個アミノ酸分上流にあり、アスニン残基は β 鎖Dのベースに位置する。これらの荷電残基は鎖域に非常に特異的なものである。最後に、疎水性残基が1をつうじて交互に存在しており、これによって、二つの β -ターンの相互作用が強化される。

T_H のVJ領域の後には、イムノグロブリンの結合(J)域及びTセル抗原レセプターと顕著な相関性を有するアミノ酸残基が続いている。第9図において、この T_H J領域は、イムノグロブリンの鎖のコンセンサスJ配列及びTセル抗原レセプターの二つの鎖と並列させて記載してある。このJ領域は

18-3110 ハイブリダイゼーションによって、 T_H 遺伝子が染色体12の短腕、12p12及び12pterの間に存在することが明らか

T_H 遺伝子を有する雄雄ゲノムクローン組を、ラムダファージベクター-Charon4及びEMBL3-3(3)内に構築されたヒトゲノムライブラリーをラジオ活性 T_H B-cDNAプローブでスクリーニングすることによって得た(70)。これらのクローンの特徴は、調製酵素及びサザンブロット分析によって明らかにされ、全 T_H コード領域が含有されていることが判明した。ジデオキシ停止法を用いて、ゲノムクローンの特異的フラグメントを配列決定することによって、 T_H 遺伝子の完全なイントロン-エクソン構造が決定された(85,86)。

第8及び10図に於いたように、 T_H 遺伝子は、8つのイントロンによって分割された9つのエクソンからなる。第1のエクソンは5'非翻訳領域及びリーダーセグメントを含む。第2のV領域 V_H は残基189に位置する大きなイントロンによって分割されている(第8図)。従って、 V_H J領域は、

(CYS) は、イントロンによって分断され、この領域の最後の部分は3' 非翻訳領域とともに第9番目のエクソンにコードされている。

T_4 及び T_5 形質転換細胞の構築

AIDSウイルス感染における T_4 の役割に関する研究において、最初に用いられた実験手技は、ウイルス感染を助けることではない T_4 細胞系内に T_4 遺伝子を導入することから成る。こうして得られた形質転換細胞はAIDSウイルスに対する感受性について試験し、次いで、 T_4 がウイルス感染を媒介するメカニズムについて研究した。

T_4 の表面抗原をコードする全长cDNAクローンをレトロウイルス発現ベクター、pMV7にサブクローン化した。発現ベクターpMV7 (第11A図) は、単一EcoRIクローニング部位を隣に有する二つの領域に反復される。半ユニークミナルターミナルのLTR (long terminal repeat) を含有している。5' -LTRはクローニング部位をつうじて構成的 (constitutively) に転写を促進し、一方、3' -LTRはRNAの切断及びポリアデニル化に必要な配列である。更に、pMV7には、細胞ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (neo^r) のコード領域が含まれている。

で増殖し得る能力を有するneo^r 陽性コロニーを選択し、in situ ロゼット形成アッセイを用いて細胞表面上の T_4 発現についてスクリーニングを行った (20,70)。 T_4 を発現している形質転換 ϕ -2細胞は、 10^5 cfu/ml の力で組換えレトロウイルスを産生するものとして同定した。この T_4 - ϕ -2クローンは次にマウス ϕ -AM細胞感染することのできるレトロウイルスを生み出す為に使われた。適量レトロウイルスを 10^4 cfu/ml の力で産生する T_4 発現 ϕ -AMクローンを単離した。 T_4 ヒト形質転換体は、マイトマイシンC処理又は ϕ -AMクローンとの共培養 (co-cultivation) によって得られた (第11B図)。 T_4 形質転換体は次いでノーザンブロット分析にかき、フローサイトメトリーによって T_4 が発現されて細胞表面に存在していることが確認された。 T_4 表面タンパクを発現するコントロール細胞系も同様の方法で作製した。

T_4 はAIDSウイルス感染に必須である。

因子 (neo) のコード領域に融合したヘルペスジンキナーゼプロモーター (tk)、ドミナントが含まれており、共形質転換及び感染をリンクすることを可能にしている。

T_4 -pMV7は、夫々、欠損自己指向性及び (anabotropic) プロウイルスを含む (4,48)、 ϕ AM細胞、及びNIH3T3細胞系に導入された。同細胞系は、内因性ウイルスRNAのキャプ (encapsidating) を起こさせることは出来なかつた。全てのトランスウイルス活性を促進し得た。 T_4 によるこれら細胞系の安定した形質導入 (トランス) によって、ヘルペスウイルスフリーの T_4 をコントロールウイルスストックの生産が生じられた。これらウイルスストックは、次いで、マウス及びヒト細胞にウイルスの病的細胞による生産なしに、 T_4 産生を開始するために使用された。

簡単に述べると、DNA-媒介遺伝子移入媒体 -pMV7-DNAを ϕ -2細胞内に導入した (27)。ネオマイシンアナログG418 (Genciclin)

及び T_{11} のみを最初に発現するものを構築した。5又は T_4 のいずれも発現せず、 ϕ 細胞感染マウス T_4 タンパク複合体のいずれをも発現しない。タンパクを発現するHSB2の形質転換体を選択し、ウイルスに対する感受性について決定した。AIDS感染を許容するために、いくつか異なる実験手技が例えば、逆転写酵素の発現 (32)、イムノフルオレクソスコピーによる細胞質内におけるウイルス発ノアッセイによる培養上清中のウイルス抗原の検トヘマゲルゲニン (PHS) -刺激抗体リンパ細胞バネート (eupenat) サブカルテニアによる感染生 (44) などが挙げられる。これらのアッセイを用HSB2細胞系のAIDSウイルス感染の監視はた (表1)。

表 1

AIDSウイルス感染に対するT₄及びT₈ヒト形質転換体の感受性

ヒト細胞	腫瘍転移細胞	免疫抑制ウイルス	浮遊物 (Spermatid) ウィルス	浮遊細胞	リンチウム 誘導	HSV(1/2) シェードタイプ 感染	ウィルス 結合
OSN(T ₄)	OSN73	-	+	+	+	+	+
H358	4243	-	-	-	-	-	-
H57E-T ₈	4409	-	-	-	-	-	-
H57B-T ₈	190915	+	+	+	+	+	+
Raji	ND	ND	ND	ND	-	-	ND
Raji-T ₈	5595	-	-	-	-	-	-
Raji-T ₄	102500	+	+	+	+	+	+
H2A	6433	-	-	-	-	-	-
H2A-T ₈	4873	+	+	+	-	ND	-
H2A-T ₄	48125	+	+	+	+	+	+

5×10⁶細胞にAIDSウイルスを接種し、37℃で240時間インキュベートし、洗浄して新鮮な地に再プレート化した。細胞及び浮遊物を3、6、9、12、18、24及び28日に取り出し、4種のウイルス検出アッセイに使用した。増殖、細胞溶解、免疫抑制ウイルス、浮遊物ウイルス検出及び浮遊物刺激である。ND、測定せず。シェードタイプ感染の結果は次のように示す。+(210³ PFU/ml)；-(10 PFU/ml)；ND、測定せず。

さらに、AIDSウイルスに対するレセプターを有する細胞とヒト細胞をAIDSウイルス産生細胞と共に培養すると広範な細胞融合が起こることが以前に示されている(54)。このアッセイにおいては、HTLV-I及びHTLV-II産生細胞により多量のリンチウムが生成されているにもかかわらず（データは示していない）、H5B2細胞をAIDSウイルス産生H9細胞と混合した場合リンチウムの誘導は起らない(表1)。

最後に、AIDSウイルスのエンベロープ糖タンパクを有する小胞状口内炎ウイルス(VSV)のシェードタイプ(pseudotype)を使用して、ウイルスの侵入(entry)を試験した(表1)(53,54)。AIDSウイルスに感染した細胞をVSVにより重感染すると、高度免疫抗VSV血清による中和に抵抗するのに十分なAIDSウイルスエンベロープ糖タンパクが一部の子孫(progeny)VSVにより誘導された。これ等のVSV(AIDS)シェードタイプビリオンの宿主範囲は、AIDSウイルスに特異的なレセプターを発現する細胞に限定

VSVが遠くのVSV(AIDS)シェードタイプ感染に指示を示す指示細胞(ミンク細胞またはウシMDB細胞)に侵入し、感染する。その検出されるVSVプラークの数をカウントする。このようにVSV(AIDS)シェードタイプの感染により、ウイルスの侵入の宿発的細胞病理(cytopathic)プラークアッセイが促される(54)。このアッセイにおいては、H5B2細胞をVSV(AIDS)シェードタイプにさらした場合、バックグラウンドに対するプラークは示されなかった(表1)。HTLV-Iエンベロープ中にシド化されたVSV RNAのシェードタイプ(VSV-HTLV-I)による対照実験では多数のプラークが示され、これはHTLV-Iレセプターを有するH5B2細胞VSVを効率的に複製できることを示している。これ等のAIDSウイルスエンベロープ中にカプシド化されたVSVゲノムはH5B2細胞中に侵入できないことを示している。

AIDSウイルスにさらすと、組織培養系場での発現により(52)、免疫蛍光顕微鏡による細胞の組織質中のウイルスの発現により(45)、イムノアッセイを使用しての培養液中のウイルス検出により(47)、そしてPHA刺激リンパ球との浮遊物(supernatant)調培養による感染性ウイルスの産生により(表1)(48)測定される、有義なウイルス感染が生起する。対照H82-T₈⁺細胞はそれぞれのアッセイにおいて一貫して陰性であった。

さらに、異なるT₈⁺細胞がAIDSウイルスに感染される効率も測定した。H82-T₈⁺及びH82-T₈⁺型質転換体、天然に単離されたT₈⁺細胞系CEM、並びにPHA刺激末梢リンパ球を、逆流的に10倍希釈したAIDSウイルスにさらし、洗淨し、プレート化して感染培養した。ウイルスに露する曝露後10日に、イムノアッセイを使用して感染培養の頻度を測定した(表1)(49)(50)。このようにして、さらした培養の50%を感染させるのに必要なAIDSウイルスの力価(ID₅₀)を決定した。PHA刺激末梢リンパ球のID₅₀は、天然に単離されたものあるいは形質転換T₈⁺細胞系について見られたものの2-3乗倍の大きさである。H82-T₈⁺

T₈⁺細胞の感染効率は、天然に単離されたT₈⁺CEMについて見られたものより約10倍高い(第H82-T₈⁺細胞は、調べた最高のウイルスも感染に対して非感受性である。

シンシチウム形成及びVSV(AIDS)シム複製の阻害を維持するH82-T₈⁺細胞の対H82-T₈⁺細胞をAIDSウイルス産生培養すると、18時間以内にシンシチウム形成が起る(表1及び表II)。さらに、シンシチウム形成T₈モノクローナル抗体で前処理することによ(表II)。そしてH82-T₈⁺細胞をVSVシェードタイプにさらすと、感染性VSV粒子がくの指示細胞を破壊する(表1及び表II)。さらに、抗AIDSウイルス抗体または抗T₈モノクローナル抗体により阻害される(表III)。対照T₈⁺細胞は、AIDSウイルス感染の検出に用アッセイのそれぞれにおいて、一貫して陰性であ(及び表II)。これらの観察は、ヒト末成熟TリンパT₈タンパクが単に存在することがAIDSウィ

要な本質的機能をもたらすという遺伝学的証拠を与えるものである。

表 II

T₈⁺ヒト形質転換体におけるシンシチウム形成

シンシチウム形成

ヒト細胞	H9/AIDS	H9/AIDS + anti-T ₈
JH(T ₈ ⁺)	+++	-
CEM(T ₈ ⁺)	++++	-
H82	-	ND
H82-T ₈ ⁺	-	ND
H82-T ₈ ⁺	++	-
Raji	-	ND
Raji-T ₈ ⁺	-	ND
Raji-T ₈ ⁺	+++	-
Raji	-	ND

(H9/AIDS)と共に培養し、37℃でインキュベーション後にシンシチウム形成について培養を調べシンシチウムに合まれる後の複製パーセンテージでシンシチウムなし; ++ (20%); +++ (50%); ++++ ND(測定せず)。シンシチウム阻害は、抗T₈モノクローナル抗体(αT₈, A:1:20)を培養時に混合培養した。天然に単離されたT₈⁺細胞系JM及びその研究の陽性コントロールとして使用した。

T₄⁺及びT₄⁺細胞質抗原中に含まれるVSVシュードタイプ細胞形成ブランクアッセイ

細胞系	VSVシュードタイプ7756 (PFU/ml)		VSV(Δ10S)		αT ₄ A
	KSJ (HTLV-1) αHTLV-1	KSJ (Δ10S)	αAIDS	αAIDS	
細胞系					
CSH(T ₄ ⁺)	50	20,000	40,000	30	200
JSB2-T ₄ ⁺	50	10,000	0	ND	ND
KSJ-T ₄ ⁺	50	12,000	1,000	100	100
Rej-T ₄ ⁺	ND	5,000	0	ND	ND
Rej-T ₄ ⁺	50	5,000	1,500	25	150
Ind ₄	ND	10,000	0	ND	ND
Ind ₄ -T ₄ ⁺	50	10,000	17,000	50	250

AIDSウィルスの感染は？リンパ球へのみに制限されない

機能性？ cDNAを2種のヒトT細胞系に導入した。即ち、子宮癌に由来する上皮細胞系であるHeLa(12)及びバーネットリンパ腫の細胞に由来するBリンパ芽球細胞系であるRej(13)である(第118図)。レトロウィルス媒介の遺伝子転移の前は、これ等の細胞系は抗原T₄タンパクあるいはT₄mRNAを発現せず、AIDSウィルス感染に対し感受性ではない(表1)。さらに親細胞系はシンシチウムの誘導及びVSV(AIDS)シュードタイプのプレーティングを維持しない(表1、B及びC)。

これに対し、T₄⁺ Rej及びRej細胞質転換体は、同様の全ての基準によりAIDSウィルス感染を保持した(表1)。

Rej、T₄⁺細胞がAIDSウィルスに感染され得る効率は、JSB2-T₄⁺細胞の場合とはほぼ同等であり、天然に感染されたT₄⁺T細胞CEMの感染の効率の約10倍高いものである(第120図)。さらに、AIDSウィルス感染H9細胞との共培

特表平2-503269(2)

2×10⁶細胞をVSV(AIDS)シュードタイプ(53.56共に2時間37℃でインキュベートした。次に細胞を洗脱し×10⁶ミントCCCL84またはウシMDCKブランク培養細胞ウェルに所えた。これ等はVSV感染を許容するが、V(AIDS)に対して低感受性である。培養を滅菌培養で感染後2日にVSVブランクをカウントした。抗T₄Aモノクローナル抗体(αT₄A:1:20)または抗AIDSウィルス血清(αAIDS:1:10)を使用してシュードタイプ(5)を約86分間に細胞を前処理することによりVSV(AIDS)シュードタイプブランク形成を阻止した。広範囲な種類の細胞型(54)上にプレートするVSV(HTLV-1)シュードタイプをこれ等の実験の対照として用いた。VSV(HTLV-1)シュードタイプブランク形成を阻止する抗-HTLV-1血清(1:10)を用いた。結果はPFU/2ND(測定せず)で表す。

(以下空白)

れ等の細胞をVSV(AIDS)シュードタイプにさらす感染性VSVが産生され、ブランクが形成されるが、これはAIDSウィルス抗体または抗T₄Aモノクローナル抗体処理による阻止される(表1及び図)。処理Rej-T₄⁺及びRej-T₄⁺細胞質転換体はこれ等の処定のそれぞれに一貫して陰性である(表1、B及びC)。

従って、機能性T₄遺伝子のヒトTリンパ球、Bリンパ球又は上皮細胞への導入は、これ等の細胞をAIDSウィルス感染に感受性にするに充分なものである。まとめると、この観察はin vivoで観察されるT₄⁺T細胞の指向性はT₄子の制限された発現の結果であり、それが発現された細胞に感受性ではないことを示している。

(以下空白)

AIDSウイルスは表面 T_4 細胞膜に結合する

前記の実験は T_4 細胞がAIDSウイルス感染に必要なとされる遺伝的証拠を提供するが、ウイルス生活環におけるこの分子の役割に関する知見は与えない。 T_4 の表面抗原がAIDSウイルス感染に必要であるという観察は、 T_4 がAIDSウイルス受容体であることを示唆している。従って T_4 及び T_4 形質転換ヒト細胞の表面に対するAIDSウイルスの結合を吟味するにはクルオロサイトメトリーが使用された(表1: 第14図)。H5B2, Raji, 及びRaji細胞、並びに T_4 又は T_4 形質転換体をAIDSウイルスと共に培養培養した。ウイルス吸収に次いで、細胞を洗浄し、フルオレセイン共役した抗AIDSウイルス抗体に曝露して、フローサイトメトリーにより解析した。この試験によりAIDSウイルスは表面 T_4 を免疫するヒト形質転換体には有効で特異的に結合するが、 T_4 細胞にも T_4 形質転換体にも結合しないことを示した(第14図B欄、表1)。AIDSウイルスの T_4 細胞に対する結合は抗 T_4 モノクローナル抗体と予培養することにより阻止されるが、抗 T_4 モノクローナル抗体との予培養ではとめられない(第14図、C欄)。更に、 T_4 形質転換細胞

かような訳で T_4 細胞系JMのAIDSウイルス感染に及ぼす塩化アンモニウムの影響を試験した。塩化アンモニウムのないばあい、AIDSウイルスに曝露したJM細胞の50%以上が、感染後5日でウイルス抗体を免疫することは免疫優先試験法により測定された通りである。ウイルスの添加時又はウイルス添加後20分以内かのいずれかで、JM細胞を塩化アンモニウムに(6時間)曝露するばあい、ウイルス感染の95%より大きな阻害が認められた。しかし、ウイルス添加後1時刻で細胞を塩化アンモニウムで処理したばあい、感染の阻害は認められず、受容体仲介のエンドサイトーシスを経て細胞に入る他のウイルスに対し記載したウイルス侵入の速度等と一致する発見であった。結局、塩化アンモニウム効果は完全に可逆的であった。塩化アンモニウムに1時刻曝露した後、洗浄により同化合物を無くしてAIDSウイルスに曝露した細胞は、ウイルス感染の割合を増大させた。これらの結果は、塩化アンモ

ニウムをAIDSウイルスに曝露するばあい、 T_4 細胞の膜(envelope)膜蛋白質と共同沈降するのはこれらの分子間の直接的物理的結合を示唆しては示さない。これらの結果はAIDSウイルスの T_4 分子に結合することと、この結合は単純しすべての型に共通するのでT細胞特異性他との関係であることを示している。

以前の研究では取り込まれたウイルスについて老人巨核が記載されている(74,75,76,77)若子巨核質と直接融合するものがあり、その巨核質細胞中に放出するのであって、その巨核質の受容体仲介のエンドサイトーシスにより取り込まれて膜、エンドソームの酸性環境は液相の境界膜との融合を容易にする。細胞膜内体経路を經由してウイルスによる感染は、エンドソームから脱離する薬剤を用いて細胞を処理することによって抑制される(58,78,79,80)。塩化アンモニウムの存在で膜中で融合が遮断されるがリソソーム低下は加速で進行する(80)。

これらの結果は、 T_4 -AIDSウイルス複合サイトーシス及びエンドソーム境界膜とのウイルス膜融合してかかわり、細胞の細胞質中にウイルスカプシドを放出するウイルス侵入の機序と整合す

T_4 メッセンジャーRNAは脳で免疫される

細胞免疫系系の破壊に加えて、AIDSがしは、中枢神経系(CNS)障害であって、それはウイルスによる脳細胞の直接感染の結果と考えられる。 T_4 がCNS内の細胞に感染し、これによりウイルスの説明を提供するかどうかを決定することに關 T_4 mRNA配列がCNSに発現するかどうかをヒトとマウスの両方の脳から調製したRNAのロット解析を実施した(第15図)。ヒト大脳皮質(A) mRNAはほぼ3及び1.8kbの分子長を有する T_4 mRNAを含む(第15A図)。より短い

既のスプライシング又は代替の5'又は3'末端から生成することができた。

T_H m R N A の存在の更に重要な解析はマウス脳の特異性からポリ(A)⁺ R N A を単離することにより実施した(第15B図)。 T_H のホスミ相同染色体である L_H T_H を記号化する放射性標識 c D N A によるハイブリッド形成は、後脳試料には存在しないマウス脳層中の強度の1.2kb m R N A を明らかにした。2.2kb L_H T_H m R N A は皮質、視床下部に検出が可助で、樹状体にもっとも豊富にあるが、小脳、脳幹、又は腎臓には存在しない(データは示さない)。C N S 中に検出される1.2kb m R N A は神経細胞中の L_H T_H を記号化する3.2kb m R N A よりも小さく、約1kbである(第15B図)。これらの結果は、AIDSウイルスが感染する免疫細胞に及ぼす T_H 分子の表面発現の特異性と思われる。脳で検出される m R N A の水準は神経細胞中の水準の約1/80である。このことは大多数の細胞による低水準の発現又は小さい部分集団の細胞による比較的高水準の発現を反映するともいえる。 T_H が神経細胞又は支持細胞により発現されるかどうかは現在知られていない。しかしながら C N S 中の異形転写体 (variant

免疫グロブリン領域は、構造的に類似しているけれども、それらが構造的異なるサブセット上の異なる分子をコードするという仮説と矛盾しない意味のある配列相違 (divergence) を示している。

T_H 及び T_H の N-末端領域によって共有される V-領域の構造的相関部分は、これらの蛋白質の機能に密に関連したものであるかも知れない。免疫グロブリン遺伝子系統群の典型的にすべての成員は、免疫応答に関連している(92)。更に、この系統群の個々の種類は互いに強力に結合して二量体を形成する傾向を示す。この結合は免疫グロブリンの産生と細胞、T細胞抗原リセプター- α 鎖と β 鎖、 β_2 -ミクログロブリンとクラス II MHC 蛋白質、並びにクラス II MHC 分子の α 鎖と β 鎖の相互作用において明白である。 T_H 蛋白質は、推定された MHC 分子である T_H と胸腺細胞表面上でジスルフィド結合を形成し、また末梢 T リンパ球上の 32kd サブユニットの多量体として存在している(83)。 T_H の 4 つの V-領域の存在は、

(transcript) の存在は、脳の T_H m R N A が稀少な免疫 T 細胞により発現することを暗示している。

2.2

T細胞の機能的に別個なサブセットを用いる T_H 及び T 分群はこれらの分子が適当な免疫調節と T リンパ球の増殖において重要になり得ることを示唆している。これらの遺伝的変異を解析する第一歩として、c D N A クロニング、及び T_H の両分子について得られ、それらの塩酸塩配決定された(26, 70)。 T_H 及び T_H のコードした蛋白質配列は、これらの分子が免疫グロブリン可变(V)ドメイン持ち、且つ免疫グロブリン超遺伝子系統群 (super gene) の構成員としての相関性配列と構造上の相関性を共有するを示している。しかしながら、 T_H 及び T_H の N-末端 V 領域は全く異なっている。すなわち、それらの分子は 225 同位を共有しているに過ぎず、従って各分子の免疫グロブリン超遺伝子に対する相同性よりも分子相互の相関性の方が低い(図)。更に、 T_H と T_H との間の特異性 (conservation) はまた免疫グロブリンに対する最も強力な相関領域及び隣り接する V 領域でもある。従ってこれらの二つの分子

によって重畳であるのかも知れない。

2.3 T_H の進化

免疫グロブリン及びT細胞抗原リセプター遺伝子において V 及び J ニュクソンは広く分岐され、体細胞の再組換えイベント (somatic recombination event) の後にのみ、安置されるになっている(62, 83)。 T_H m R N A は、DNA 組換えイベントを必要とすることなく、連続的 (contiguous) V-及び J エレメントを 4 つコードする。従って、 T_H は再配列 (rearrangement) メカニズムの発現以前に存在したより原始遺伝子を反映している可能性がある。このことはさらに、 T_H の V-領域 (V1) が、免疫グロブリンもしくは抗原リセプターのいずれかをコードする V 遺伝子中に存在しないイントロンによって分割されているという最近の知見によって支持される。イントロンが進化過程で次第に深くなり、及び、イントロンが以前にはイントロンのない環境中に置かれることは極めてありうることであるということは、度

ファミリーを形成したと考えられる。現在の極めて複雑な免疫系においても議論しているが、 T_4 はより原始的な細胞系免疫応答において様態するレセプターを反映しているであろう。無脊椎動物のもののように、原始的な免疫応答は、レセプター分子の単純レパートイヤー (diversa repertoire) を含まないと考えられるが、最も単純な場合には、自己及び非自己の間の区別に限定され(85,86)、さらに再配列を起こさない「静的な」遺伝子群によって説明されると思われる。

進化時に T_4 の出現の順序がどのようなものであれ、この遺伝子の構成はニクソン融合 (shuttling) の興味深い例を示している。 T_4 は4つのV-J-様領域から成っており、J-様領域及び膜間セグメント (transmembrane segment) は、スーパー遺伝子ファミリーの異なるメンバーでの相同性を各々分け持っている。V-及びJ-様領域は、免疫グロブリンとT細胞抗原レセプター軌の両方の祖先する領域と相同である。膜間領域は、クラスII MHC分子のB-鎖におけるこの領域とかなりの相同性を示す(第90図)。従って、 T_4 は免疫グロブリンのスーパー遺伝子ファミリーのいくつかのメンバーにおいて保存されたエクソンの融合から成っており、この遺伝子ファミリーは異なる

ウイルスによって利用されてきた。

細胞表面レセプターは多数のエンベロープド・ウイルスについて同定されてきており、しばしば宿主の範囲及び宿主ウイルスの指向 (tropic) 性はこれらのレセプターの発現のパターンにせいである(74,76)。あるウイルスはごく狭い範囲の細胞タイプに感染し、他の細胞の特定集団におけるウイルスレセプターの発現に依存する。例えば狂犬ウイルスはニコチン性アセチルコリンレセプターと相互作用し、骨格筋とニューロンに大きく感染する(87)。ところがEB (Epstein-Barr) ウイルスはCD3抗原レセプター・タイプ2と相互作用し(88)、Bリンパ球に感染する。ミクソウイルスのような他のウイルスは細胞表面に普遍的に分布するシアル酸残基と相互作用し、より広範囲の細胞タイプに感染する。

細胞表面レセプターの制限された発現は、ウイルスの向性に対する唯一の説明を供給する。あるウイルスは、分化した細胞タイプの制限された1つのセットにおいてのみ複製する。従っ

て、宿主細胞に感染する種々の多くの形式で融合されて、免疫応答に関与する種々の多くの成分する。

T_4 はAIDSウイルスレセプターである

本明細書で提示したデータは、先ず細胞表面においてウイルスと T_4 分子との特異的な結合を伴うAIDS感染のメカニズムを示す。この結合は、Tリンパ球、単核及び上皮細胞において証明され、従ってT細胞のバクとの関与を必要としない。更に、本明細書に提示したデータは、 T_4 - AIDSウイルス複合体はレセプター-シグナルトランスドューションによりインターナル化され、次にエンベロープはニクソンの細胞膜と融合し、ヌクレオプシドを細胞質に放出することを示す。ウイルス複製は、リンパ系及び非リンパ系細胞の両方で起こり、 T_4 遺伝子は感染後にリンパ系において発現し、AIDSの二重向性性 (dual tropic) 及びリンパ系 (lymphotropic) 特性に対する一つの説明を提供する。やり方において、特に T_4 細胞の集団に対するAIDSを模倣するため、エプシロン細胞-改変細胞の導入するのに重要なTリンパ球抗原タンパクが、ヒト

白血球を誘導する(89,90,91)。この向性には、Tリンパ球のゲノム及び赤血球先駆体のT_H-MuLVゲノムの効率的な複製を促進するT_Hにおける複製の特長と思われる。

本明細書に示したように、AIDSウイルスの複製因子は標的細胞の表面に結合する T_4 タンパクの発現Tリンパ系細胞及び骨髄系細胞並びに腎臓細胞へのin vivo阻害される：3つの集団は T_4 を表す。in vivo実験は T_4 希少Bリンパ球及び上皮細胞 (これらの細胞はウイルスにとっての天然の標的ではなく、AIDSによる免疫不全に感受性にする) への誘導を示す。

変化的11可溶性 T_4 フラグメント

可溶性 T_4 糖タンパク質フラグメントを細胞膜成分からロテアゼ消化法を使用して調製する。代わりに、トランス-ドメイン (領域が中性及び疎水性残基を含む T_4 フラグメントをコードするDNA発現ベクター) を用いる。そのような T_4 フラグメントを作るのに使用しても、

分泌される。

実施例2: AID5感染の治療

患者の血液及び他の体液中に存在するウィルスに結合して、*in vivo* で T_4^+ 細胞の感染をブロックするため、実施例1に記載した可溶性 T_4 フラグメントは、典型的には臨床的に許容可能なキャリアー中で、ヒト免疫不全症ウィルスに感染した患者に投与される。代わりに又は更に、ウィルスが血液から分離し得るように患者の血液は固定化 T_4 フラグメント又は可溶性 T_4 フラグメントのいずれかを含むカラムを介して処理される。そのような処置は免疫システムがウィルスに対しより効果的な免疫応答をすることを可能にする。即ち非感染 T_4^+ 細胞を増殖させる。

可溶性 T_4 フラグメントは治療的なもの、即ち使用するHIV感染の細胞外及び細胞-細胞感染の阻害剤として使用する。本出願人は、可溶性 T_4 フラグメントが *in vitro* で HIV が T_4^+ 細胞の細胞に対して結合、感染することを阻害することを示した(実施例4参照)。可溶性 T_4 フラグメントの HIV に感染したヒトへの投与は、ウィルス感染の細胞外感染を阻害する。更に、HIV-感染 T_4^+ 細胞及び非感染 T_4^+

トランスメンブレンセグメントの端で終結し、ヌクレオチド位置約126で開始する(第6図)。この組み換えDNA分子はトランスメンブレンと細胞質ドメイン間を欠く。2.6 kb EcoRI-HpaI フラグメント(ヌクレオチド1~1258を含む)を pT₄B のより小さいフラグメントから誘導することにより、単離する。代わりに、スプレッド(spearing)のみを除去し、細胞質ドメインに融合した V_4 J₄ ドメインを脱離する。1つのアプローチは、pT₄B 由来ヌクレオチド1252~1342から *NotI* 部位を抽出フラグメントを除去することである。このような誘導物は、ラフ小胞体/ゴルジ装置体に入し、結晶として細胞から分泌するのに必要な T_4 シグナル配列を維持する。さらに、これらの誘導物は T_4 タンパクの細胞外部分を維持し、ここでヒト免疫不全症ウィルスエンベロープ糖タンパク質が存在する。

哺乳類系で可溶性 T_4 フラグメントを発現するために、融合した T_4 cDNA フラグメントを、強い直中プロモーター

細胞の融合(これはウィルスが拡散するルートである)性 T_4 フラグメントの投与により阻害される。

従って、可溶性 T_4 フラグメントの投与は病気の進行を、AIDSに併発いくつかの症状を軽減し、新しい感染の発生を阻害する。

生化学的に純粋で水溶性試薬である可溶性 T_4 フラグメントは、 T_4 -HIV相互作用の結合体(complex)を形成の試薬と組み合わせる。HIVエンベロープ又はHIVエンベロープタンパクを含有する生化学的と組み合わせた可溶性 T_4 フラグメントを、ウィルス結着剤をスクリーニングするのに使用する。

実施例3: 可溶性 T_4 フラグメントの製造

融合した T_4 タンパク(pT₄B)をコードするcDNAを単離し、転写化し、哺乳類細胞クイブの装置で発現(10)。可溶性 T_4 フラグメントはバクテリア、酵母、哺乳類の系で産生する。恐らく T_4 タンパクは膜に接しているため、哺乳類の系における発現が好ましい。可溶性 T_4 フラグメントは V_4 J₄ ドメインの端で pT₄B のり取ることにより産生する。このようなDNAフラグメント

ンハンサーは、可溶性 T_4 cDNA フラグメントから上置する。SV40又は可溶性 T_4 cDNA フラグメントのヒト成長ホルモン遺伝子のいずれかのポリアダニル化配列することにより、転写終結及びRNAポリアダニル化する。当業者は公知の任意の方法により選択マーカーにこれらのエレメントを含有する複製物の産生物への外国性DNAの安定な組み込みを導く。選択培養における成長能力により選択される形質転換体は、培養上清液へ T_4 フラグメントを分泌する。可溶性 T_4 フラグメントのいくつかのアッセイの内の1つ(例えば、ラジオイムノアッセイ)より上清液中で検出し、精製する。可溶性 T_4 フラグメントの精製及び貯蔵は細胞株を凍結することにより著しく増進される。これは分泌したタンパクフラグメントを阻害過多にする。タンパクの発現過多にさせる方法が、バクテリア、酵母、及び哺乳類の系で使われる。もし誘導的に発現したならば、タンパクを産生過多にするため、誘導可能な細胞系を

の増殖)の連続的に増す濃度の成長によりジヒドロチロシンレダクターゼ(dhfr)遺伝子の増幅が広く用いられた。配列をコードするdhfrに対し増幅されたユニットは破壊されないで、このアプローチはそれらに隣接する配列の同時増幅(cocopying)する結果になった。従って、dhfrを選択的マーカーとして、及び新たに導入した配列を同時増幅する手段として使用する。この方法は、dhfrプラスミドでコトランスフォーメーションされた種々の遺伝子の発現を増加するのに非常に有用である。例の増幅スキームはプラスミドpJL1A-T₄と可溶性T₄cDNA発現ベクターのコトランスフォーメーション、次いで底に配列した選択を行う(102)。

従って、可溶性T₄cDNA発現構築物は、dhfr発現プラスミドとコトランスフォーメーションされる。代わりに、可溶性T₄cDNAフラグメントと同じプラスミド上にdhfr遺伝子が存在し、リンクしたコトランスフォーメーションを許す。これらの構築物のdhfr欠失(dhfr⁻)チャイニースハムスター胚系(CHO)細胞へのトランスフォーメーション及び最終メトトレキサートにおける選択は、新たに導入した配列を発現する安定な形質転換体を分離させる。いくつかのクローンを

複製し、培養上清液を回収し、可溶性T₄フラグメントを分析する。可溶性T₄フラグメントの最大レベル1クローンはノーザンブロット及びサザンブロット分析に特異化される。次いでこれらの細胞株は、単一のメトトレキサートを含む選択地で培養される。この細胞は新たに導入したdhfr遺伝子及び可溶性T₄質を、メトトレキサート最大濃度に達した後、培養液をノーザンブロット及びサザンブロット分析して、片方を決定し、可溶性T₄フラグメントの存在について片方を調べた。

培養上清液中の可溶性T₄フラグメントの特異化のいくつかの形質転換体を(³⁵S)-メチオニンで代謝させる。細胞溶解物(lysis)及び上清液を次いで可溶性T₄抗体を用いるラジオイムノアッセイ及びウエスタンブロット分析で分析する。BDS-ポリアクリルアミドゲルを支持体として電気泳動し、分離され、端を切った形のT₄対分子重(M_r)を視覚化する。哺乳類系で合成されるタンパクは通常にグリコシル化し、折り重なってホジスルフィドブリッジが形成する。培養上清液から可

フラグメントを遊離するため、抗-T₄抗体を用いるイムノアフニティーカラムクロマトグラフィーを実施する。カラムに結合したタンパクを高塩濃度及び低pHで洗脱する。M_r及び洗出したタンパクフラクションの純度を決定するため、洗出した物質のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を実施する。アフィニティー精製した物質をより特異化するため更に、ラジオイムノアッセイ及びウエスタンブロット分析を実施する。

可溶性T₄フラグメントを産生するために同様のアプローチをバクテリア、酵母、昆虫で試してもよい。更に、本明細書で記載したより小さいサイズのフラグメント(例えばV₁, J₁, Dメインのみを含むような)を産生してもよい。

(以下空白)

ベクターの構築

組換えDNA操作を使用して、ヒトT₄cDNA断片(19)1-1057を、SV-40複製プロセクターとポリリン酸塩基のポリアダニル化環境に従属するT₄RNAとの間に配置した。T₄cDNAのこの断片はT₄のリーダー及び予測された細胞外ドメインをコードし、このsT₄と遺伝子をとトH-ras又はマウスジヒドロチロシンレダクターゼと結合して、両ベクターpST₄cDEPST₄、DHPERを作製した。これらのベクターの例のように行った。

pST₄salの構築:

プラスミドpST₄salを、他の2つのプラスミド及びpUC₂T₄から構築した。これらのプラスミド以下に詳述する。

プラスミドJRT₄の構築:

プラスミドJRT₄を作製するために、プラスミド

領域(113)をBglII及びKpnIで切断し、KpnI部位をT₄ DNAポリメラーゼで処理して平端化した。この38bp断片をDSP1に結合してDSP1-BGHを作製した。DSP1-BGHをSmaI及びSalIで切断し(SV40初期プロモーター、galコード領域及びBGHポリA領域から成る)galカセット(carsette)を、SalI末端、BglII末端及びSmaI末端から成る合成リンカーを使用することにより、pUC18(101)中のSalI部位に結合した。この3つの部分結合の結果、プラスミドDSP1BZBGH、JTが得られた。

DSP1BZBGH、JTをSluI及びBclIで切断してgalコード領域を欠失させたものを、プラスミドpT₄B(70)由来T₄cDNAを含む1.7kbのEcoRI(フィールド-イン)-BamHI断片に結合して、プラスミドpT₄Bを作製した。
プラスミドpUCcT₄の構築:

プラスミドpUCcT₄を作製するために、プラスミドpT₄B由来T₄cDNAのHaeIIおよびHpaII断片(1126bp)を、XbaI及びXbaIで切断されたベクターpUC18に合成リンカーを用いて結合した。T₄cDNAのHaeII末端を、KpnI末端及びHaeII末端をもつ合成リンカーを用いて

pUC18のKpnI部位に結合した。T₄cDNAのHaeII末端、HpaII末端及びXbaI末端をもつ合成リンカーをpUC18のXbaI部位に結合した。このリンカーもT₄領域のヌクレオチド(151)の後のTAA停止コドンに結合した。得られたプラスミドはpUCcT₄であった。

プラスミドpST₄BR1を作製するために、プラスミドT₄をBglII及びSmaIで切断して(SV40初期プロモーターとT₄cDNAの最初の601個のヌクレオチドとから成る850bp断片を生成した。プラスミドpUCcT₄をSmaI-XbaIで切断して(合成リンカー由来TAAコドンに結合した)ヌクレオチド638-1257に由来するT₄cDNAから成る680bp断片を生成した。これらの2つの断片を、BglII-XbaIで切断してSV40初期プロモーター及びフルレ:T₄コード領域を欠失させたDSP1BZBGH、JTに結合した。

pST₄DNFRの構築:

プラスミドpST₄DNFRを作製するために、 β -インターフェロン発現カセットを含むBglII-BamHIをpST₄galのBamHI部位に結合した。 β -グロビン

DNFR発現カセットは、マウス β -グロビンプロモーター(BglII部位を含有させるために合成リンカーを用いてプラスミドpSVK284(104)の5'末端を修飾した。該プラスミド由来の(48bp HhaI断片)、マウスDNFRコード領域(プラスミドpSV2-DNFR(109)由来の735bp HindIII(フィール-イン、fill-in)、DSP1(103)由来のNaeI(フィール-イン)-BamHI(フィール-イン)SV40ポリA初期領域、及びマウスDNFR終止領域(BamHI部位を作製するために合成リンカーを用いてプラスミドpMD19(119)の3'末端を修飾した該プラスミド由来の907bp HindIII(フィール-イン)断片)から成る。pST₄DNFRのプラスミドマップは図示のとおりである。

pST₄cHrasの構築:

プラスミドpSVK(211)をEcoRV及びHindIII(フィール-イン)で切断してgal領域を除去し、さらにプラスミドpSKcHras(212)由来の、cHrasに関するコード領域を

可溶性T₄転写カセットをBglII-BamHI断片を用いてpST₄galから取り出し、pMGRC-HrasのBamHI(SV40初期ポリAに対して3')端に結合してpSTcHrasを作製した。

肺癌細胞中での可溶性T₄(cT₄)とニニヒテ子の発現: NIH-3T3細胞中でのpST₄cHrasの発現:

10 μ gの宿主DNA(NIH-3T3ゲノムDNA)と、G418耐性を有するベクターであるプラスミドpST₄cHras(10 μ g)をNIH-3T3細胞(前日、毎皿当たり5 \times 10⁵細胞を接種したもの)上に共培養させる。この細胞を沈殿DNAと一緒に37℃で6時間インキュベーションした。DNA沈殿物を取り出し、新鮮な培地(DMEM %FCS 10% (Collaborative Bioproducts, Inc., Lexington, Massachusetts))を添加し、16時間後、細胞をトリプシン処理し、5つの100mm皿中に接種し、次いで上記培地

Grand Island, New York) 中に選択用の細胞 5×10^5 個/100 ml 血を接種した。11個のクローン全てが G418 選択 (500 μ g/ml) に生きたが、次に該クローンを標準タンパク質イムノブロット分析により B-725 (pZ1) に関してスクリーニングした。

最も高いレベルの pZ1 (約 200 pZ1/ μ g -725 可溶性タンパク質) を発現したクローンを、 35 S-標識メチオニン及びレステインと一緒に185時間インキュベーションした。培養上清及び細胞溶解物を、 T_4 (OKT₄, OKT₈, A) 及び T_8 (OKT₈) リセプターに対して特異的なモノクローナル抗体、123 タンパク質に対して特異的なポリクローナル抗体、又は非特異的マウス IgG を用いて免疫沈降させた。 T_4 の予言されたサイズである約 45 kD のタンパク質を、 T_4 リセプターに対するモノクローナル抗体の両方を用いて培養液地から特異的に沈降させた。細胞溶解液中に、 T_4 バンドは観察されなかった。期待どおり、pZ1 を該細胞から沈降させたが、培養上清からは沈降しなかった。これに続く培養は、精製 T_4 と比較して、これらの細胞が、実施例 2 B に記載の CHO 細胞を用いた場合よりも約 100 倍低い比較的低レベルの T_4 を

産生した。20 nM メトトレキサート (mtx) を含有するスクレオシド非含有培地中で選択を開始する 3 日後に細胞を回収した。何々のウェル又はクローンを T_4 免疫に関して集合的にアッセイし、さらに増幅用に選択したクローンを上記の密度で 24 穴培養プレート中に接種した。接種後 3 5 日に、スクレオシド非含有培地中の 800 nM mtx での選択を開始した。この選択法を 8 nM mtx 及び 10 nM mtx での選択に繰り返し適用した。この方法を用いて、最小 300 細胞/24 時間で可溶性 T_4 を発現する数個の細胞系を誘導した。

T_4 の精製:

mtx 選択条件下、350 ml ローラーボトル中に拡散させた付着性細胞培養物から、血清非含有のコンディショニング培地 (CM) を調製した。集合的に、 Mg^{2+} 及び Ca^{2+} を含まないリン酸塩緩衝食塩水 (PBS) で細胞を 2 回洗浄し、血清培地 (ヒポキサンチン及びチミジンを含む Hae's F12, 10% ウシ胎児血清, 100 ユニット/ml ペニシリン及びストレプトマイ

シンを含む) を添加している。

チヤニニズハムスダー細胞 (CHO) での pZ1

DHFR の発現:

DXB-11 細胞、すなわち DHFR 分化 CHO 細胞を、10 μ g の溶泳 DNA (NIH-3T3 ゲノム DNA) 在り、10-30 μ g の pZ1 DHFR を用いてリン酸ム沈降によりトランスフェクションし、2 日後、60% 10^5 細胞を接種した。この細胞を DNA 沈降物と一緒に 6 時間インキュベーションし、培地を取り除き、次の培地 (F12, 10% FBS, 100 ユニット/ml ペニシリン及びストレプトマイシン) を該細胞に添加した。16 時間後、井交換し、細胞をさらに 24 時間インキュベーションした細胞をトリプシン処理し、3 つの 100 mm 皿中に接種し、オンコ非含有培地 (ヒポキサンチン及びチミジンを 2-12, 10% 血清 FBS, 並びに 100 ユニット/ml ペニシリン及びストレプトマイシン) 中で選択した。7-10 日以内に (約 100/皿) が採られた。各皿からロニーをブーク引き集めた後、24 穴培養プレート中に 5×10^3 細胞及び 5×10^4 細胞/ウェルを、又は 5×10^5 細胞/

24-28 時間後、この培地を取り除き、選択性培地と次いで、3-5 日以内に、血清非含有培地を添加し、のサイクルを 2 ヶ月以上の間、再初限に繰り返した。8 での遠心分離によって CM を希薄させた。プロテアゼ PMSF (フェニルメチルスルホニルフルオリド) となるように希薄し、加圧濾過により CM を除いた。この濃縮 CM を 2,000 $\times g$ での遠心分離によりプロテアーゼ阻害剤 アプロテニン (Sigma Chemical, Missouri) を最終濃度 5 μ g/ml となるように添加した。ブルを直接又は -70°C での保存後に添加した。

濃縮した CM サンプルを 50 mM MEB [2-(N-メチル)エタンスルホン酸], pH 8.0 で 2 倍に希釈し、9.4% イルターを過して濾過した。次に、このサンプルを pAMPMSF (p-アミノフェニルメチルスルホニルフルオリド) [CalBiochem-Rohm and Co., San Diego, California] を最終濃度 5 μ g/ml となるように希釈した。562M MCB, pH 8.0 で平衡化した S-Sepharose

線形的濃度勾配を用いて、このサンプルを露出させた。約 0.2 M NaCl で溶出したピークフラクションをブールし、pA P M S F 100 μ M で処理した。s T₄ を含むフラクションを SDS-PAGE 及びイムノブロットアッセイによって確認した。4℃に1時間放置した後、50mMピストリスプロパン [1,3-ビス[トリス-(ヒドロキシメチル)-メチルアミノ]プロパン]、pH8.0 に対して該サンプルを透析した。

このサンプルを 100 μ M pA P M S F で処理した後、68mMピストリスプロパン (BTP)、pH9.0 で平衡化した Q-Sepharose[®] (第四級アミノエチル) カラム (Pharmacia) (5 ml サンプル/ml-ゲル) に適用した。s T₄ サンプルは Q-Sepharose[®] に結合せずに、非結合フラクション及びカラム洗滌液中に回収された。非結合サンプルをすぐに pH8.0 に調整した。

最終ステップとして、50mMリン酸塩、0.15M NaCl、pH7.0 で平衡化した 80 ミクロン Suparose[®] 12 カラム (2.5 x 100cm) (Pharmacia) 上でクロマトグラフィーを行った。カラムは 3.0 ml/min の流速で移動液作された。10ml ずつ分画され、42 分目のピークをバッチ操作により採取した。この方法によって、約 3

OKT₄ A は、T₄ レセプターの非干渉表面エピトープを認識する (114)。これらの抗体は、イムノブロット分析において還元 SDS 変性蛋白質に結合しないことから、非イオン性コンフォーメーションで特異的である。次に記載するような免疫沈澱法を記すと、該両方の抗体は ³⁵S-ラベル濃度上清から s T₄ を特異的に沈澱させることが明らかにされている。

80mM 希薄液 1 つあたり 1×10^6 個の細胞を含有する s T₄ -産生細胞の培養物を、1.5 ml のメチオニンとシステインを含まない R T S、170 μ Ci/ml の ³⁵S]メチオニンと 30 μ Ci/ml の [³⁵S]システインを含む P12 培養液 (カリフォルニア州コスタメサ市の I C N Biomedicals, Inc.) において、18 時間 37℃でラベルした。精製細胞 (100 μ l) を等容量の沈澱バッファ (10mM のリン酸ナトリウム pH7.5、100mM の NaCl、0.1% NP-40、0.5% の脂肪非含有乾燥ミルク) で懸濁し、15 分間 4℃で 3 μ l のウサギ g G とともにインキュベートし、更に 30 分間 4℃で 80 μ l (充填容量) のプロテイン A セファロー

ex/細胞/日を産生する細胞系に懸し、全タンパク質あたり約 1.0 μ g の生成物が得られた。

s T₄ の特徴

物理的性質：全蛋白質組成は、カラーメトリック RC 所産 (ピシニコニミック社、イリノイ州ロックフォード Pierce Chemical Co. 提供) を用いて決定した。絶対量的アミノ酸分析法で決定した。精製 s T₄ のアミノ組成的なアミノ酸分析により決定したが、実験所産の範囲内で当該分子の予想したシーケンスと一致しとが判った。最初の 20 残基については、そのシーケンスと作りであったが、ただ lys-lys-val-val-... で終わる。成熟アミノ末端は予想したリーダークリップに対して +3 の位置から始まっており、当該位置でブレイクポイントとは s s n から l y s 変化で異なっていた。ミノ末端の位置は、マウスおよびシーブ C D 4 蛋白質においておいた末端とよく一致している。s s n から l y s は、シーケンシング上のエラー (単一の塩基変化) による操作中に生じた突然変異のためであると思われる。
イムノエピトープ：モノクローナル抗体 OKT₄ 及び

Ortho Pharmaceuticals Corp. の P.920 氏から提供をマウス Ig G (ペンシルバニア州 Hazelville の Cooper Biomedical)、又はウサギの α -マウス Ig G (Coop Biomedical) と 30 分間 4℃でインキュベートした。OKT₄ A、OKT₄ B、マウス Ig G およびウサギ α Ig G は、20 μ l (充填容量) のプロテイン A セファローズとともに 30 分間 4℃でインキュベートすることにより吸着させた。沈澱に続いて、ビーズを 2 回 800 μ l の R T S で洗滌し、その後 NP-40 と豚脂肪乳凝乳ミルクで 200 μ l の沈澱バッファで 1 回洗浄した。洗滌ビーズのサンプルバッファ (125mM Tris-HCl pH8.0、リセロール、1.4 M β -メルカプトエタノール) 中で洗滌し、1:5% SDS-ポリアクリルアミドゲル上での電気泳動を分析した。同じような結果が、OKT₄ A、OKT₄ C、OKT₄ D、OKT₄ E、OKT₄ F および特異的な他の Habs について得られた。これらの結

H:Vの T_4 細胞への結合を阻止し得るか否かを確かめるため、約5μgの精製 sT_4 を、OK T_4 もしくはコントロール試料で処理したセファローズビーズに吸着させた。次いでこのビーズを³⁵S-メチルメチンベロII Vの感染細胞と混合した。

sT_4 とOK T_4 の結合体は120kDのエンベロープ糖蛋白質のみを識別させる。 sT_4 が存在しないか又はトランスフェクションしていないCHO細胞からのコントロール上清が存在する場合には、OK T_4 ビーズで沈降するウィルス抗原物質は向もない。また、コントロールとしてのマウス免疫グロブリン

(OK T_4 に吸着させたアイントープ)で被覆したセファローズビーズを sT_4 とともにインキュベートしても、ウィルス性蛋白質は沈降しない。これらの研究は、Tリンパ球の表面に存在する他の細胞表面成分をもちない sT_4 がAIDSウィルスのエンベロープ糖蛋白質と特異的に結合し得ることを示している。

サイトフルオロメトリーを使って、完全なH:Vのgp120と T_4 との相互作用によりAIDSウィルスの T_4^+ 細胞表面への結合が阻止されることが示された。 T_4^+ CEM細胞を sT_4 を存在させるかさせないでH:Vにさらした。ウィルス感染の

後、細胞を溶解し、フルオレスセイン結合式-H:Vらし、フローサイトメトリーで分析した(第17図)。 sT_4 が存在しないと、H:Vは T_4^+ CEM細胞に結合する。H:Vを sT_4 でプレインキュベートすると sT_4^+ 細胞への結合は阻止される(第17図)。10μmの精製 sT_4 は、ウィルス性蛋白質160ナノグラム阻止するのに充分である。エンベロープ糖蛋白質が全性蛋白質の5%を含むなら、 T_4 gp120のモル比が5:1なるH:Vの T_4^+ 細胞への結合を完全に阻止

H:Vによる T_4^+ 細胞の感染を阻止し得る sT_4 調べた。フォトヘマグナニン細胞ヒトリンパ球を存在させるか又は存在させないでH:V被覆材料の逐次にさらし、洗浄し、そしてマイクロカルチャーに接種ウィルスにさらした後4日、8日および12日にイムノを用いて感染培養の頻度を決定した(47)。このように白目の感染細胞培養の50%を感染するのに必要な複製感染性ウィルス力価ID₅₀とした。 sT_4 が存在しないウィルス被覆材料を用いて感染したID-30は約 10^5 しかしながら、精製した可溶性 T_4 を8マイクログ

存在させると、感染性は約4 log₂だけ $10^{4.5}$ のID-50に減少する(第18図)。このH:Vによる感染性の減衰は、感染の全コースに亘って認められる。非特異的な阻止又は sT_4 の毒性影響に対するコントロールとして、ウィルスへの初期感染後8時間たって sT_4 を培養物に添加した。感染後18時間たって sT_4 に露出した培養物はID-50において1 log₂阻止しか示さない。このことはおそらく初期感染の後ウィルス拡散が阻止されたためであろう。このように、ウィルスを sT_4 とプレインキュベートした際にみられるウィルス感染性の4 log₂減少は、ウィルス表面上での sT_4 とgp120との特異的な結合によるものであると思われる。したがってこれらの因子はやはり感染表面上の T_4 レセプターと相互作用することができない。1あたり 10^5 個の感染性粒子を sT_4 の8マイクログラム/mlとプレインキュベートするときにも、4 log₂阻止が認められた。

10^5 個の感染性粒子/mlのウィルス懸濁液は、 10^9 粒子/mlを含有すると計算される。仮に各粒子が1800のエンベロープ糖蛋白

T_4 と抗原細胞の表面および T_4 とH:Vウィルスの間のメカニズムに関する研究を促進させることができる。 T_4^+ ヘルパー細胞と抗原細胞(antigen-presenting (B細胞およびマクロファージ)との相互作用の重要性)なくとも部分的には、 T_4 とクラスII MHC分子との関係とも思われる(188,189)。かなりの量の精製 sT_4 であるなら、 T_4 とクラスII MHC分子との間の相互作用を直接調べることができる。

sT_4 がgp120と結合し得る能力および sT_4 がH:Vウィルス感染を阻止し得る能力は、 sT_4 がAIDS病に有効な抗ウィルス剤であることを示している。

実験例4: 可溶性V1V2/4可溶性T-4フラグメントベクター構築

pST₄-EBV: DHFRの構築: プラスミドpST₄-DHFRをつくるため、プラスミドpST₄-DHFR(例3に記載)をEcoRIおよびXbaIで切断し、 sT_4

グしてから一日経過した後、 $10 \mu\text{g}$ のキャリア-DNA
(NH-3T3ゲノムDNA)を存在させて、リン酸カルシウム沈降法により $10 \sim 30 \mu\text{g}$ のpST-4184D3F1Rをトランスフェクションした。沈降物を6時間後に取り出し、10%胎児ウシ胎血清を含むハイボキサンチン又はチミジンを含むないF12培地に置き換えた。コロニー(1つの皿あたり約100)が18日後に表れた。各皿のコロニーをプールし、拡張し、24ウェルの培養プレートに1ウェル当り 5×10^4 回の細胞をシードした。これらの細胞を、ヌクレオシドを含まない $10 \mu\text{M}$ のメトトレキサート(MTX)を含む培地で成長させ、トランスフェクションしたdhfr⁺ V1V2J4ミニ遺伝子の可能性ある増殖のために選択した。5dのMTX中で2週間後、顕微的に成長する細胞を明らかに認めた。欠失変異株(deletion mutants)の発現を調べるため各ウェル又はコロニーを集団的に分析し、更に増殖のために選択したものを上に記載したのと同じ密度で24ウェル培養プレートにシードした。高レベルのV1V2J4を発現する多数のサブポピュレーションをMTXのレベルを増加しながら成長させ、dhfr転写単位とT4184(V1V2-J4)ミニ遺伝子を更に増殖させるため選択した。いくつかの細胞系

をこのようにして誘導した。これらは少なくとも約2/3の基で欠失変異株を発現する。

MTX選択条件下に800 cellローボトル中に拡張し、胎児動物から血清を含まないなし培地(CM)を無菌的に細胞を、 10^4 と 10^5 を含まないリン酸カルシウム(PBS)で2回洗浄し、成長培地(ハイボキサンチンとリンを含まないDMEM, 10%胎児血清, 100 cellのペニシリン、ストレプトマイシン、および選択的MTX)を、血清とMTXを除き 1×10^5 S(インシュリン、スフェリン、セレンウム(Collaborative Bioproducts Inc.))を加えた同じ培地に置き換えた。24-48時間後培地を限定的成長培地に交えた。血清含有培地を次いで3日以内に再び加え、このサイクルを無限に、すなわち2回繰り返した。CNを2000gの過心分離にかけてきれいプロテアーゼ阻害剤PMSF(フェニルメチル sulfonyl fluoride)を0.5mMに加え、圧力フィルターでCMを換えた。この濃縮CMを2000gの過心分離にかけてし、プロテアーゼ阻害剤であるアプロタニン(Aprotinin, 1000 unit/mlのSigma Chemical)を5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の最終

えた。サンプルを直接凍結するか又は-16°Cで貯蔵した後処分した。

ウェスタンブロット分析: V1V2J4産生CM細胞からのなし培地を濃縮し、15%ポリアクリルアミド還元ゲルにかけた。蛋白質をニトロセルロース紙に移し、過酸化水素で 1×10^4 分子に対するポリクローナル抗血清で検出した。この抗血清は、約25kDで移動するV1V2J4グプレットを特異的に認識する。これは、リーダープロセッシング後のV1V2J4コードシークエンスの予想されたサイズに相当する。このグプレットの物理的な位置は明らかでない。これはN-リンクしたグリコシレーションの差から生じたものとも思われる。ただし、このグリコシレーションのためのT-4における2つのコンセンサスシークエンスはV1V2J4に存在しないからである。

免疫ニビトープ: モノクローナル抗体OKT-4及び、OKT-4A, OKT-4B, OKT-4C, OKT-4D,

ファセイにおいて、凍結された、BDS変性タンパク質のコンフォメーションに対して特異的である免疫析出法を用いて ^{35}S -ラベル培養上清から、双方特異的にV1V2J4を析出することが明らかになった。V1V2J4を生成する細胞を8000の培養皿あたり細胞含有する培養物を、1.5 mlのメチオニン及びシス含まず、ITS及び170 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ の ^{35}S メチオニン30 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ の ^{35}S システイン(1 CN Biomedical Inc., Costa Mesa, CA)を含むF12培地中、37°Cで16日処理した。透明培地(100 μg)を毎日の抽出バッファリン酸ナトリウムpH7.5(100 mM NaCl, 0.1 % NP-0.5 % 非脂肪ドライミルク)で希釈し、3 μg のウサと共に4°Cで15日間インキュベートした。その後、96核密度のタンパクAセファロースビーズ(Pharmacia Biotechnology)で4°Cで36時間処理した。予め精製血清を、各々5 μg の上記したOKT、抗体、マウス

ウス1とGを、20 μ g（充填容量）のタンパクセファロース
ビーズと共に4℃で90分間インキュベートして析出させた。析
出のもの、ビーズを、100 μ gの析出バッファーで2回、250
 μ gの析出バッファーからN μ P-40 μ 及び無菌乾燥ドライミルク
を除いた溶液で3回洗浄した。洗浄したビーズを20 μ gのグン
ブルバッファー（125mM トリス-HCl, pH8.0, 20%グリセ
リン, 1.0M β -メルカプトエタノール）中で3分間煮沸し、
その上清を15.5% SDS-ポリアクリルアミドゲル上で電気泳
動により分析した。OKT μ を除いて、モノクローナル抗体の
各々は、 35 Sでラベルした発覚上清からV1V2V4を純真的
に析出させた。

B1V結合の結合

OKT4AによるV1V2V4の認識は、V1V2V4が
AIDSウイルスの感受性細胞に対する結合を阻害するであ
うということを示した。V1V2V4を含有するかまたはそれ
を欠如するCMを最初のアッセイに使用した。B1VをCMと
共にインキュベートし、T-4 μ CEMセルラインに対するウ
イルスの結合は、McDoogalら、supra(1995)に記載のよう
にして、F1TC結合抗-HIV抗体とのインキュベーションお

びPACS（フルオレセイン活性化セルソーター）分
析で定量化した。V1V2V4を生産するセルラインに出
るCMは希釈度依存的にB1V結合を阻害したが、高和
（saturated）非結合（DxB-11）細胞に由来するCM
からの阻害も見られなかった。

タンパクV1V4はCBO細胞中で周縁に発現した。
これらの予備実験において、明らかにこのタンパクは
は輸送されなかった。他の組換えタンパクで誘導された
がOKT μ Aに結合することを示す別の研究によると、
この細胞培養で発現されたV1V4はB1V結合を阻
害すると思われる。

実施例5：可溶性のT μ 断片抗体の調整

完全フロイントアジュバントに1:1の容量で入れ
の複製可能なT μ 断片（上記のようにして調製）50 μ g
の521b/cマウスの腹腔内に注射する。その後一月毎
フロイントアジュバントと混合した可溶性T μ 断片を
ブーストし、尾静脈を通して採血する。血清のイムノ
グロブリン成分を硫酸アンモニウム沈澱により作成し、固定化
断片を用いるアフィニティークロマトグラフィーによ

の抗-可溶性T μ 断片抗体を精製する。

実施例6：可溶性T μ 断片式-イデオタイプ抗体の調整

完全フロイントアジュバントに入れた本発明の複製抗-可溶性
T μ 断片抗体（上記のようにして調製）50 μ gを遠心性細胞が
同じで同様のマウスの腹腔内に注射し、不完全フロイントアジ
ュバントに入れた抗-可溶性T μ 断片抗体を毎月ブーストする。
融合の4日前、3日前および2日前に、生理食塩水に入れたイ
ムノグロブリン50 μ gをマウスの腹腔内にブーストする。次に、
既に記載されており本発明に係る分野で公知の手段に従って、
脾細胞をP3X63 AG8.655 非分泌性ヒューマ細胞と融合する。
2週間後、ハイブリドーマの上清の抗-可溶性T μ 断片抗体に
対する結合能をラジオイムノアッセイによってスクリーニング
する。次いで、陽性のクローンについて、ヒト免疫不全ウィル
スエンベロープタンパクおよびAIDSウイルスに対して結
合する能力を決定する。また、「ワンステップ」法を用いて、
完全フロイントアジュバントに入れた可溶性T μ 断片をマウス

T μ 断片抗-イデオタイプ抗体に関して決定する。

下記の文献は明細書中に引用されたものである：

REFERENCES

1. E.L. Reinherz et al., "Discrete Stages of Human Interthymic Differentiation: Analysis of Normal Thymocytes and Leukemic Lymphoblasts of T Cell Lineage", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 1582-1587 (1980).
2. E.L. Reinherz and E.Y. Schlossman, "The Differentiation and Function of Human T Lymphocytes", *Cell* **10**: 821-827 (1980).
3. M.L. Blue et al., "Coexpression of T_H and T_H on Peripheral Blood T Cells Demonstrated by Two-color Fluorescence Flow Cytometry", *J. Immunol.* **134**: 2201-2206 (1985).
4. E.G. Engleman et al., "Activation of Human T Lymphocyte subsets: Helper and Suppressor/Cytotoxic T Cells Recognize and Respond to Distinct Histocompatibility Antigens", *J. Immunol.* **131**: 2126-2129 (1983).
5. A.M. Krensky et al., "Long-term Human Cytolytic T-Cell Lines Alloreactive for HLA-DR6 Antigen Are OKT⁸+", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 2366-2369 (1982).
6. S.C. Kruer, E.P. Schlossman and E. Reinherz, "Clonal Analysis of Human Cytotoxic T Lymphocytes T_H and T_H Effector T Cells Recognize Products of Different Major Histocompatibility Complex Regions", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 4315-4319 (1982).
7. L. Rogersinski et al., "The T_H Surface Antigen Is Involved in the Induction of Helper Function", *J. Immunol.* **132**: 735-739 (1984).
8. E.L. Svain, "Significance of L₂ Phenotypes: L₂ Antibodies Block Activities of T Cells that Recognize Class I Major Histocompatibility Complex Antigens Regardless of Their Function", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 7101-7105 (1981).
9. U. Lindgren et al., "Selective Inhibition of Human T Cell Cytotoxicity at Levels of Target Recognition of Initiation of Lysis by Monoclonal OKT⁸ and L₂-2a Antibodies", *J. Exp. Med.* **155**: 1573-1584 (1982).
10. R.M. Zinkernagel and R.C. Doherty, "MHC-restricted Cytotoxic T Cells: Studies on the Biological Role of Polymorphic Major Transplantation Antigens Determining T Cell Restriction, Specificity, Function, and Responsiveness", *Adv. Immunol.* **27**: 52-177 (1979).
11. J. Kappler et al., "The Major Histocompatibility Complex-Restricted Antigen Receptor on T Cells in Mice and Men: Identification of Constant and Variable Peptides", *Cell* **25**: 1075-1076 (1980).
12. D.R. Nardo et al., "Evidence Implicating Class II MHC Antigen Reactivity No Antibody GK 15 (Anti-L₂) Blocks MHC Antigen-Specific Proliferation, or Lymphokines and Binding by Clonal Helper T Lymphocyte Lines", *J. Immunol.* **217**: 2167-2169 (1983).
13. S.L. Swain, "T Cell Subsets and the Role of MHC Class", *Immunol. Rev.* **14**: (1983).
14. Y. Thomas et al., "Functional Analysis of Human T Cell Subsets Defined by M₁ Antibodies. IV. Induction of Suppression Within the OKT⁸ Population", *J. Exp. Med.* **154**: 489-497 (1981).
15. E.G. Engleman et al., "Antibodies to Structures that Distinguish Suppressor and Helper T Lymphocyte Subpopulations Block the Mixed Leukocyte Reaction", *J. Exp. Med.* **154**: 193-198 (1981).
16. P. Marrack et al., "The Major Histocompatibility Complex-Restricted Antigen Receptor on T Cells. II. Role of the 137kD Peptide", *J. Exp. Med.* **155**: 1077-1081 (1982).
17. P. Kavathas et al., "Isolation of T_H Coding for the Human T Lymphocyte Leu-2 (T_H) by Gene Transfer and Cloning", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 7692 (1984).
18. D.R. Littman et al., "The Isolation and Sequence of the Gene Encoding T_H: A Defining Functional Class of T Lymphocytes", *Cell* **40**: 237-246 (1982).
19. V.P. Sukhatme et al., "The T Cell Differentiation Antigen Leu-2/TS is Homologous to Immunoglobulin and T Cell Receptor Regions", *Cell* **40**: 591-597 (1982).
20. S.M. Friedman et al., "OT-1: A Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Transduces IL-2 in High Titer", *J. Immunol.* **93**: 938-940 (1982).
21. D.A. Thorley-Lawson, L. Cress and J. Mihner, "Suppression of In Vitro Epstein-Barr Virus Infection: A Key Role for Adult Cells", *J. Exp. Med.* **155**: 499-508 (1982).
22. J.W. Goding, "The Chronic Chloride Ion Coupling Antigens to Erythrocytes:

26. M. Wigler et al., "Biochemical Transfer of Single-Copy Eucaryotic Genes Using Total Cellular DNA as Donor", *Cell* **14**: 725-731 (1978).
27. M. Wigler et al., "Transfer of Purified Herpes Virus Thymidine Kinase Gene to Cultured Mouse Cells", *Cell* **13**: 223-232 (1977).
28. J.M. Chirgwin et al., "Isolation of Biologically Active Ribonucleic Acid from Sources Enriched in Ribonuclease", *Biochemistry* **18**: 5294-5299 (1979).
29. H. Aviv and P. Leder, "Purification of Biologically Active Globin Messenger RNA by Chromatography on Oligothymidylic Acid-Cellulose", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 1408-1412 (1972).
30. T. Huynh, R.A. Young and R.W. Davis, "Construction and Screening cDNA Libraries in ϕ 10 and ϕ 11", *DNA Cloning Techniques - A Practical Approach*, D.M. Glover, ed. (Oxford: IRL Press), in press.
31. T. Maniatis et al., "The Isolation of Structural Genes from Libraries of Eucaryotic DNA", *Cell* **15**: 687-701 (1978).
32. M.M. Davis et al., "Cell-Type-Specific cDNA Probes and the Murine β Region: the Localization and Orientation of λ^5 Alpha", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 2194-2198 (1984).
33. T. Maniatis, I.F. Fritsch and J. M. Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Cold Spring Harbor Laboratory) (1982).
34. P.W.J. Rigby et al., "Labeling of Nucleic Acid to High Specific Activity in Vitro by Nick Translation with DNA Polymerase I", *J. Mol. Biol.* **113**: 237-251 (1977).
35. J. Vieira and J. Messing, "The pUC 19 an M13mp7-Derived System for Insertion, Cloning and Sequencing with Synthetic Sal Primers", *Gene* **19**: 259-268 (1982).
36. F. Sanger, S. Nicklen and A. Coults, "Sequencing with Chain-Terminating Nucleotides", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463 (1977).
37. E. Southern, "Detection of Specific DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis", *J. Mol. Biol.* **28**: 503-517 (1975).
38. G.M. Church and W. Gilbert, "Genomic Sequencing", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 1993 (1984).
39. R.H. Scheller et al., "A Family of C-Code for ELK, a Neuropeptide ELK Stereotyped Pattern of Behavior in Cell", *Cell* **33**: 707-719 (1982).
40. Y. Liang, J. Dimaio and T. Maniatis, "Cloning of Two Distinct Regulatory Regions Adjacent to the Human Beta-Interferon Gene", *J. Immunol. Meth.* **76**: 1 (1983).
41. C. Terhorst et al., "Further Structural Studies of the Heavy Chain of HLA Antigens and Its Similarity to Immunoglobulins", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 4002-4006 (1977).
42. J.A. Hedo, L.C. Harrison and J. Roth, "Binding of Insulin Receptors to Lectins: Evidence for Common Carbohydrate Determinants on Several Membrane Receptors", *Biochemistry* **20**: 3385-3393 (1981).
43. U.K. Laemmli, "Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4", *Nature* **227**: 680-685 (1970).
44. R. Mann, R.C. Mulligan, and D. Baltimore, "Construction of a Retrovirus Packaging Mutant and its Use to Produce Helper-Free Defective Retrovirus", *Cell* **12**: 153-159 (1983).
45. F. Barre-Sinoussi et al., "Isolation of a T Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS)", *Science* **220**: 868-871 (1983).
46. V.S. McDonald et al., "Cellular Tropism of Virus (LAV)", *J. Immunol. Meth.* **76**: 1 (1983).
47. J.S. McDougal et al., "Binding of HTLV-LAV to T4⁺ T cells by a complex 110K viral protein and the T4 molecule", *Cell* **22**: 382-385 (1983).
48. C.B. Kaiser et al., "Standardized ligand binding assays for alpha-1-antitrypsin in immunofluorescence and related techniques", W. Knapp, K. Holubar, W. Wick, eds. (Amsterdam: Elsevier/North Press) p. 139 (1978).
49. W.B. Wilson and P.M. Maxam, "Recent developments in the periodate method of cyanogen bromide peroxidase (MBPO) to analyze immunofluorescence and related techniques", W. Knapp, K. Holubar, W. Wick, eds. (Amsterdam: Elsevier/North Press) p. 218 (1978).
50. J. Porath, R. Axen, and S. Ernback, "Coupling of proteins to agar", *Nat* **149**: 1491-1493 (1967).
51. B.J. Friesz et al., "Detection and

- Neutralization by cateinase" *sepa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 2886-2889 (1984).
54. A.G. Delgataish, et al., The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **332**, 763-766 (1984).
 55. M. Papovic, et al., Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and Pre-AIDS. *Science* **224**, 497-500 (1984).
 56. K. Nagy, et al., Ruben T-cell leukemia virus type 1: induction of syncytia and inhibition by patients' sera. *Int. J. Cancer* **22**, 321-328 (1983).
 57. D.M. Neville and N. Glossner, Molecular weight determination of membrane protein and glycoprotein subunits by discontinuous gel electrophoresis in Cedebyl sulfate. *Methods Enzymol.* **22**, 92-102 (1974).
 58. A. Helenius, et al., On the entry of Semliki Forest virus into 8HK-21 cells. *J. Cell. Biol.* **84**, 404-420 (1980).
 59. R.O. Cone and R.C. Mulligan, High-efficiency gene transfer into mammalian cells: Generation of helper-free recombinant retroviruses with broad mammalian host range. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 6342-6353 (1984).
 60. F.W. Alt et al., "Probes for Specificity by Subtractive Hybridization: Analysis of Expression of Immunoglobulin Genes", in *Gene Regulation*, R.Axel, T.Manis, C.P. Fox, eds. (New York: Academic Press, 407-419 (1979)).
 61. M. Kozak, "Comparison of Initiation in Synthesis in Prokaryotes, Eucaryotes, and Mitochondria", *Microbiol. Rev.* **47**, 3-45.
 62. L. Haad, M. Kronenberg and T. Hunkapil, Cell Antigen Receptors and the Immune Supergene Family", *Cell* **59**, 125-129 (1980).
 63. S. Tonegawa, "Somatic Generation of Diversity", *Nature* **302**, 575-581 (1983).
 64. J. Kyte and R.F. Doolittle, "A Simple Method for Displaying the Hydropathic Character of Amino Acids", *J. Mol. Biol.* **32**, 105-132 (1957).
 65. G. von Heijne, "Patterns of Amino Acid Sequence Cleavage Sites", *Eur. J. Biochem.* **133**, 17-21 (1983).
 66. B.A. Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (Washington: U.S. Department of Health and Human Services, p. 281 (1982)).
 67. A.F. Williams et al., "Cell Surface Proteins and the Origins of Immunity" *Proceedings of the Sigmoid Symposium*, L.C. Anderson, G.G. Gatzberg, eds. (New York: Academic Press), in press (1984).
 68. J. White, M. Kleiman and A. Helenius, Membrane fusion proteins of enveloped viruses. *Quart. Rev. Biophys.* **15**, 1-45 (1983).
 69. P.Y. Chou and G.D. Fasman, "Empirical Prediction of Protein Conformation", *Ann. Rev. Biochem.* **47**, 251-276 (1978).
 70. P.J. Maddon, et al., The isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the T cell surface protein T4: A new member of the immunoglobulin gene family. *Cell* **42**, 93-104 (1985).
 71. R.A. Acheson, A. Flowers and H.J. Davis, Direct implantation and serial transplantation of human acute lymphoblastic leukemia in hamsters, 65-2, *Can. Res.* **28**, 1121-1125 (1968).
 72. G.O. Gey, W.D. Coffman and M.T. Kubicek, Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* **11**, 244-265 (1952).
 73. E. Oikarinen, et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (Washington: U.S. Department of Health and Human Services, p. 281 (1982)).
 74. A.F. Williams et al., "Cell Surface Proteins and the Origins of Immunity" *Proceedings of the Sigmoid Symposium*, L.C. Anderson, G.G. Gatzberg, eds. (New York: Academic Press), in press (1984).
 75. J. White, M. Kleiman and A. Helenius, Membrane fusion proteins of enveloped viruses. *Quart. Rev. Biophys.* **15**, 1-45 (1983).
 76. M. Marsh, The entry of enveloped virus cells by endocytosis, *Biochem. J.* **21**, 1-10 (1984).
 77. M. Kleiman and A. Helenius, Entry of viruses. In: *The Togaviridae and Flaviviridae*, S. Schlesinger and M.J. Schlesinger, eds., (Plenum Publishing Corp.), pp. 1-10 (1986).
 78. S. Oikarinen, and B. Poole, Fluorescence measurements of the intracellular living cells and the perturbation of various agents, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 3327-3331 (1978).
 79. P.R. Maxfield, Weak bases and ionophores reversibly raise the pH of vesicles in cultured mouse fibroblast cells. *Biol. Cell* **24**, 576-581 (1982).
 80. A. Helenius, M. Marsh, and J. White, Entry of Semliki Forest virus particles into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 6342-6353 (1984).

82. P.M. Snow, M. Van de Rijm and C. Tetherst, "Association Between the Human Thymic Differentiation Antigens T6 and T8", *Eur. J. Immunol.*, in press (1985).
83. P.M. Snow and C. Tetherst, "The T6 Antigen is a Multimeric Complex of Two Distinct Subunits on Human Thymocytes but Consists of Homomultimeric Forms on Peripheral Blood T Lymphocytes", *J. Biol. Chem.* **258**: 14673-14681 (1983).
84. C. Tetherst et al., "Biochemical Analysis of Human T Lymphocyte Differentiation Antigens T6 and T8", *Science* **232**: 520-521 (1986).
85. V.M. Hildemann, "Immunocompetence and Allelic Polymorphism Among Invertebrates", *Transplantation* **21**: 1-3 (1979).
86. V.L. Scofield et al., "Protochordate Allograft Recognition is Controlled by a MHC-like Gene System", *Nature* **292**: 499-502 (1982).
87. T.L. Lents, et al., Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor?, *Science* **218**: 182-184 (1982).
88. J.D. Fingereth, et al., Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the CD3 receptor CR2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 4510-4514 (1984).
89. P.Z. Tanhousin, et al., The physiopathology of Friend leukemia, *Leukemia Res.* **2**: 117-129 (1979).
90. A. Oliff, et al., Isolation of trans erythrocytosis cells from mice with helper-independent Friend murine virus, *Blood* **58**: 244-244 (1981).
91. J.E. Silver and J.M. Fredrickson, Ability to Friend helper virus less CXB recombinant (inbred mice, *J. Virol.* **58**: 1693-1703 (1987).
92. P.A. Chatlis, et al., Role for the the genome in determining disease of Friend and Moloney murine leukemia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: (1985).
93. P.A. Chatlis, et al., A 3' end fragment possessing the transcriptional enhancer nondefective Friend virus confers leukemogenicity on Moloney leukemia virus, *J. Virol.* **52**: 240-254 (1984).
94. A. Bosis, H.J. Thiesen and P. C. transcriptional enhancer with specific erythroid cells is located in the terminal repeat of the Friend murine virus, *EMBO J.* **2**: 1615-1623 (1986).
95. A.M. Barclay, et al., Immunoglobulin structures associated with varicella, in press.
96. M.O. Dayhoff, M.C. Barker and L.T. Hunt, Establishing homologies in protein sequences. In *Methods in Enzymology*, Enzyme Structure Part I, C.K.W. Hirs and S.N. Timasheff, eds. (New York: Academic Press), pp. 526-645 (1983).
97. Y. Yanagi, et al., A human T cell-specific cDNA clone encodes a protein having extensive homology to immunoglobulin chains, *Nature* **308**: 143-149 (1984).
98. G.K. Sim, et al., Primary structure of human T-cell receptor α -chain, *Nature* **312**: 171-173 (1984).
99. M. Saito, et al., A third rearranged and expressed gene in a clone of cytotoxic T lymphocytes, *Nature* **312**: 36-40 (1984).
100. M. Saito, et al., Complete primary structure of the β chain and gene of the mouse major histocompatibility complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 5520-5524 (1983).
101. M. Isobe, et al., The gene encoding the T-cell surface protein T4 is located on human chromosome 12, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 117-121 (1984).
102. D.E. Piatt, G. Sathya and M.E. Roff, Modular Cloning Vector for the Analysis of Eucaryotic Genes and Gene Regulation, *Gene* **41**: 161-167 (1986).
103. G. Urlaub and L.A. Chasin, Isolation of mouse Haploerythroid Cell Mutants Deficient in Adenylate Cyclase Activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**: 4210-4214 (1983).
104. Gay, D. et al., *Nature* **328**: 626-629 (1987).
105. Slockman, B.D. et al., *Nature* **228**: (1987).
106. Yanisch-Parron, et al., *Gene* **31**: 103 (1981).
107. Barry, P., et al., *Mol. Cell. Biol.* **1**: 1183 (1981).
108. Subramani, et al., *Mol. Cell Biol.* **1**: 1181 (1981).
109. Prayne, et al., *Mol. Cell Biol.* **1**: 1184 (1981).
110. Schumperli, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 117-121 (1984).

Figure 3B

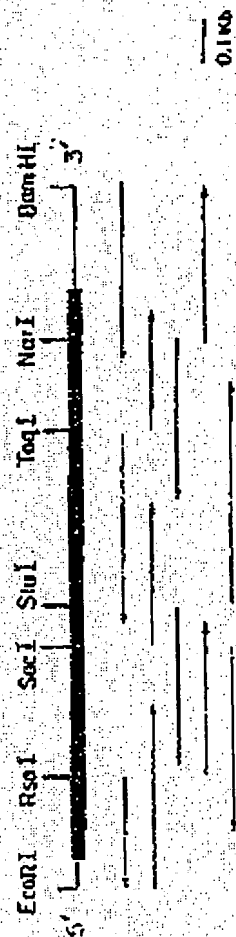


Figure 3C₁

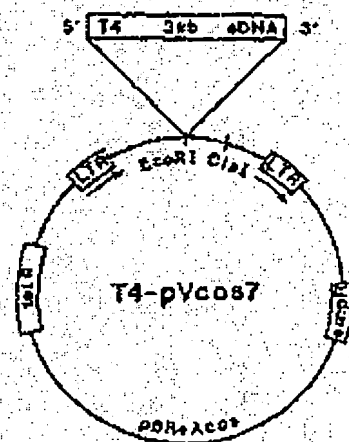


Figure 3C₂

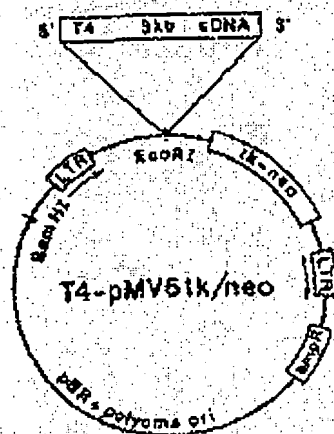


FIGURE 4

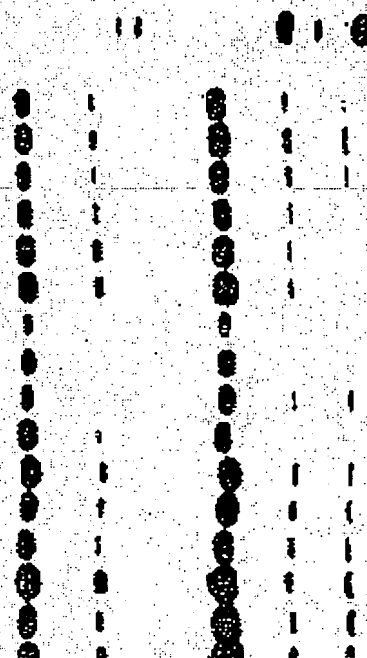


FIGURE 5

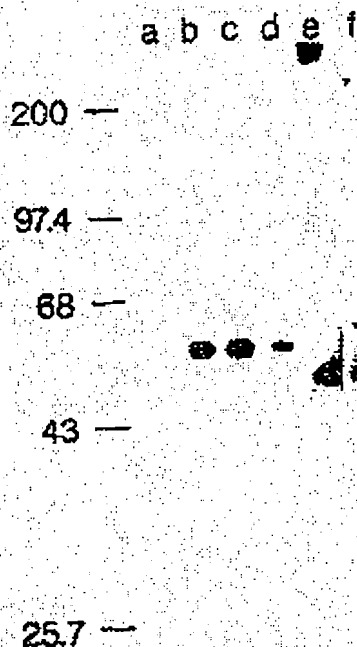


Figure 6A₂

-20
 met asp arg gly val pro phe arg his leu leu
 GCGAGCGGCA ATG AAC CCG CGA GTC CTT TTT AGC CAC TCG CTT 194
 +10
 val val leu gly lys lys gly asp thr val glu leu thr
 GTC GCG CCG GGC AAA AAA GCG GAT ACA GTC GAA CCG ACC TGT 198
 +40
 gln ile lys ile leu gly asp gln gly ser phe leu thr lys
 CAG AAT AAG ATT CCG CGA AAT CAG GGC TCC TTC TTA ACT AAA 286
 +70
 asp gln gly asp phe pro leu ile ala lys asp leu lys ile
 GAC CAA CGA AAC TTC CCG CCG ACC ATC AAG AAG CTT AAG ATA 378
 +100
 val gln leu leu val phe gly leu thr ala asp ser asp thr
 GTC CAA TGC CTA CCG TGC CGA TTC ACT GGC AAC TGT CAC ACC 468
 +130
 gly ser ser pro ser val gln cys arg ser pro arg gly lys
 GGT ACT ACC CCG CGA CCG CAA TGT AAG AGT CGA AGC GGT AAA 558

Figure 6A₁

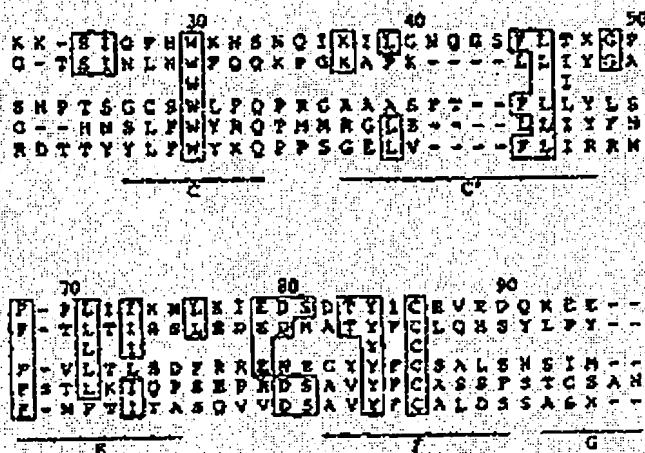
EA ₁	E
GB ₁	E

-10
 leu val leu gln leu ala leu leu pro ala ala thr gl- gly asp
 CCG CCG CCG CAA CCG GCG CCG CCG CGA CGA CCG ACT CAG CGA AN
 +20
 thr ala ser gln lys lys ser ile gln phe his trp lys asp ac
 ACA CCG TCC CAG AAG AAG ACC ACA CAA TTC CAC TCG AAA AAC TC
 +60
 gly pro ser lys leu asp asp arg ala asp ser arg arg ser le
 CCG CGA TCC AAG CCG AAG CAG CCG CCG CAC TCA ACA ACA ACC CT
 +80
 glu asp ser asp thr tyr ile cys glu val glu asp gln lys gl
 CAA CAC TCA GAT ACT TGC ACC TGT GAA CCG GAG CAC CAC AAG CA
 +120
 his leu leu gln gly gln ser leu thr leu thr leu glu ser pr
 CAC CCG CTT CAG GCG CAG ACC CCG ACC CCG ACC TTC CAG ACC CA
 +140
 asp ile gln gly gly lys thr leu ser val ser gln leu glu le
 AAC ACA CAG GCG CCG AAG ACC CCG TCC CCG TCT CAG CCG GAG CA
 +160
 lys val glu phe lys ile asp ile val val leu ala phe gln le
 AAG CCG CAG TTC AAA ATA CAC ACC CCG CCG CCG CCG TTC CAG AC
 +200
 ser phe pro leu ala phe thr val glu lys leu thr gly ser g
 TCC TTC CGA CCG CCG TTT ACA CTT CAA AAG CCG ACC CCG ACT G

Figure 6B₁

+230
 ile thr phe asp leu lys asp lys gln val ser val lys a
 ACC ACC TTC CAC CCG AAG AAC AAG GAA CCG TCT GTA AAA O
 +250
 leu thr leu pro gln ala leu pro gln tyr ala gly ser g
 CCG ACC CCG CCG CAG GCG TTT CCG CAG TAC CCG GCG TCT G
 +290
 val asp leu val val met arg ala thr gln leu gln lys a
 CCG AAC CCG CCG CCG ATC ACA CCG ACT CAG CCG CAG AAA A
 +320
 leu lys leu glu asp lys glu ala lys val ser lys arg g
 TTC AAA CCG CAG AAC AAG GAG CGA AAG CCG TCC AAG CCG G
 +350
 leu asp asp ser gly gln val leu leu glu ser asp ile l
 CCG ACT CAG TCG CGA CAG CCG CCG CCG GAA TCC AAC ATC A
 +380
 leu gly gly val ala gly leu leu leu phe ile gly leu g
 CCG GCG GCG CCG GCG CCG CCG CCG CCG TTT TTT ACT GCG CTA C
 +410
 met ser gln ile lys arg leu leu ser glu lys lys thr c
 ATG TCC CAG ATC AAG ACA CCG CCG ACT CAG AAG AAC ACC T

Figure 9A.



Piece 93

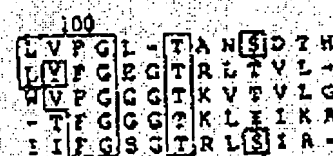


Figure 9C



Figure 10

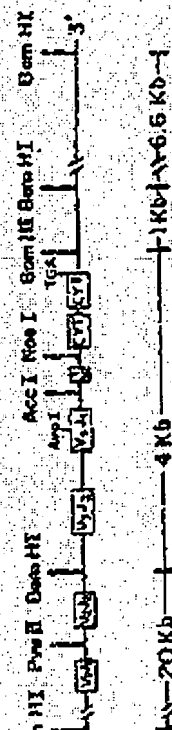


Figure 11A₂

Figure 11A₁

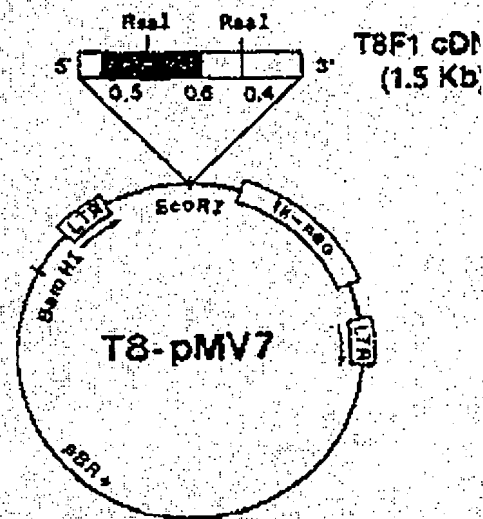
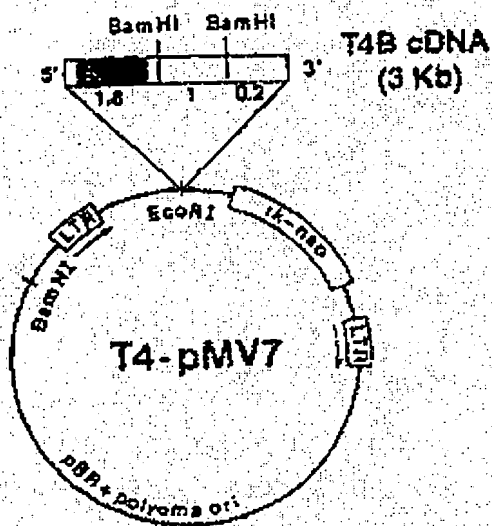


Figure 11B₂

Figure 11B₁

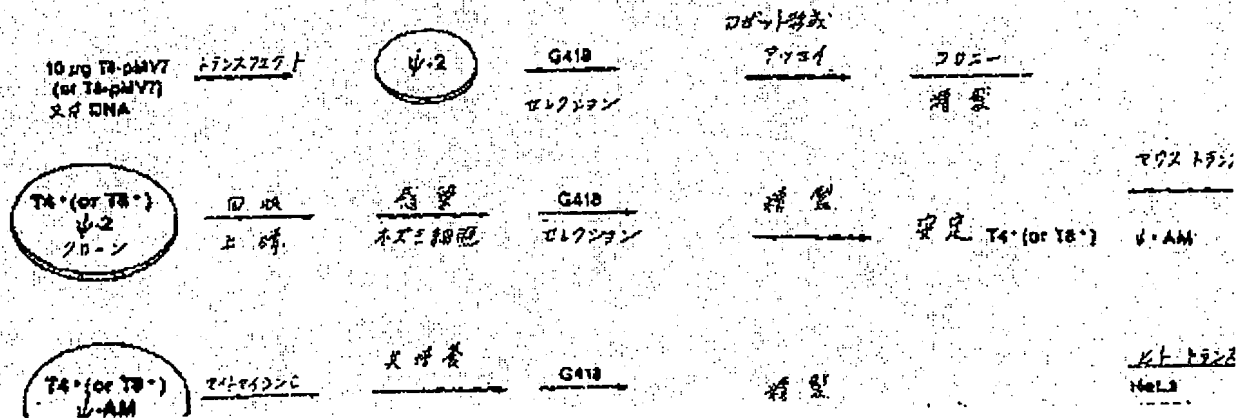
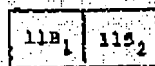


Figure 12

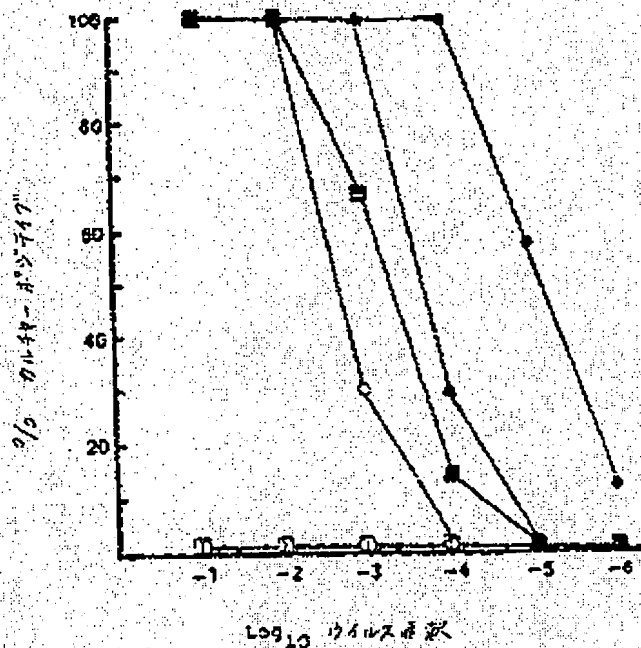
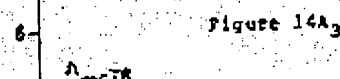
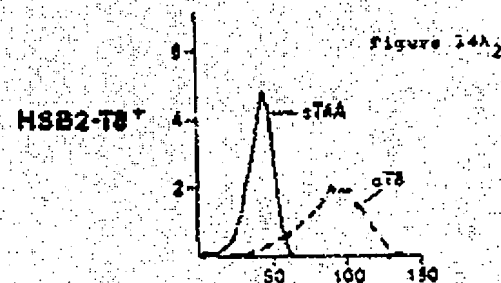
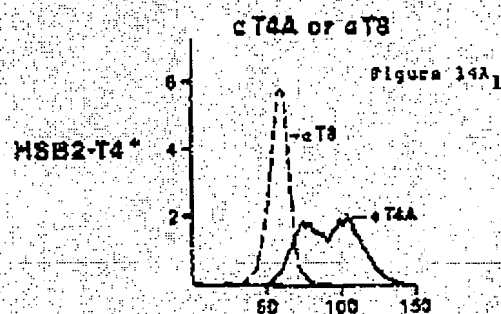
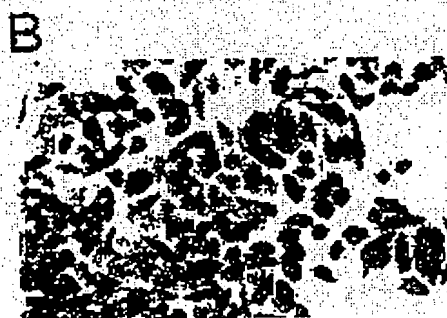


FIGURE 13A



FIGURE 13B



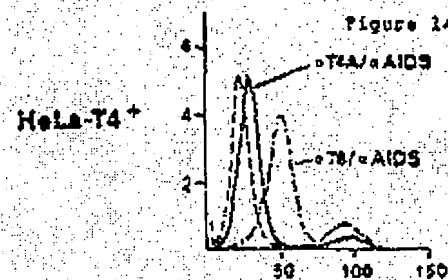
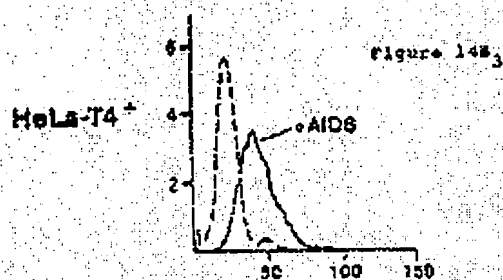
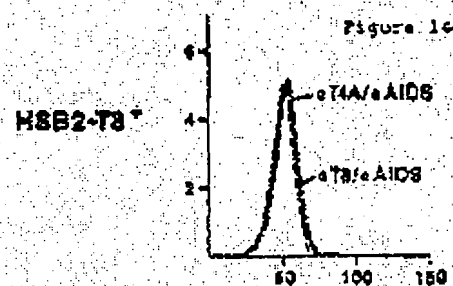
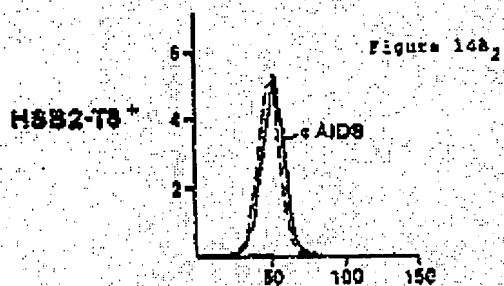
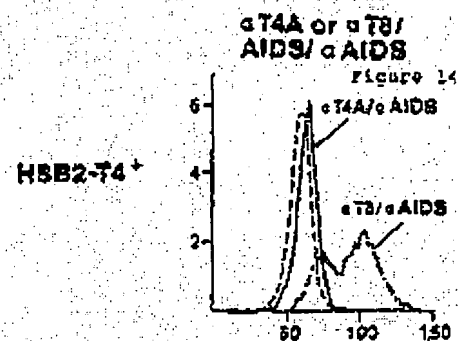
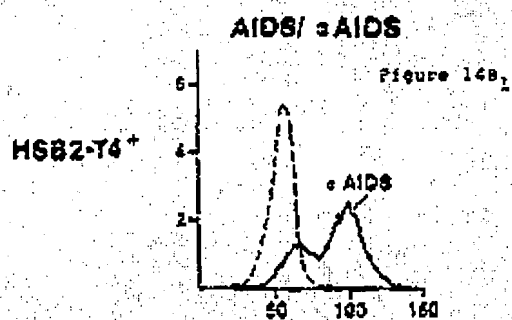


FIGURE 15A

FIGURE 15B

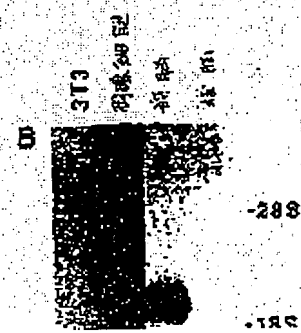
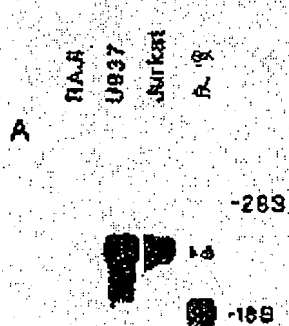
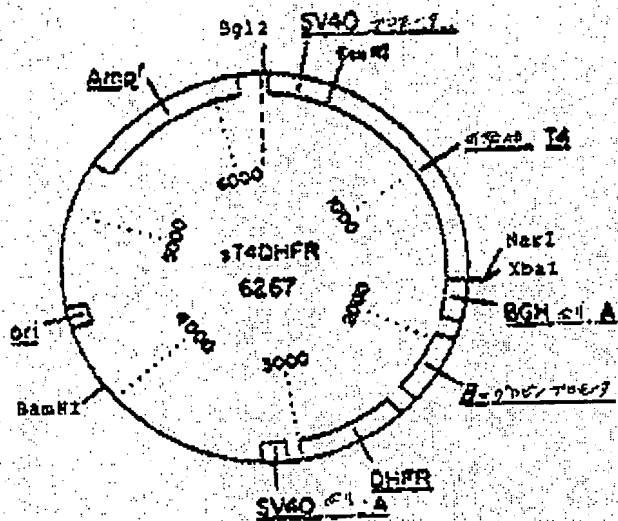


Figure 16



T4 +370
 -- thr pro val gln pro met ala leu --
 -- ACC GCG GTC CAG CCA ATG GCC CTC --

T4
 -- thr pro val thr
 -- ACC GCG GTC TAA TGGCGGCTGTACA --
 RpaII NarI KpnI

Figure 17

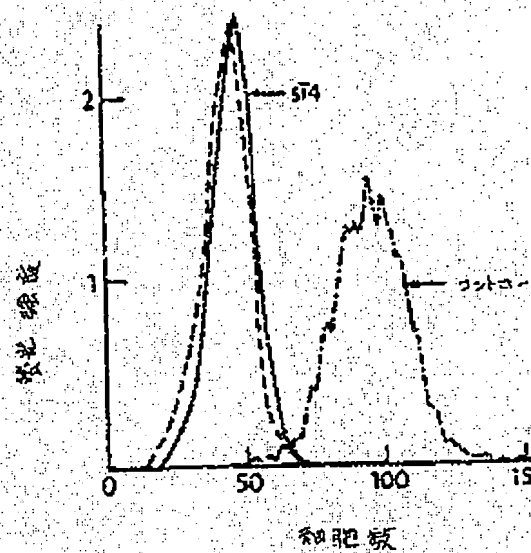


Figure 18A

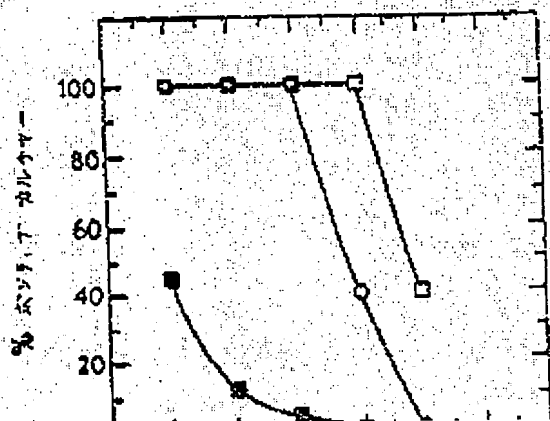
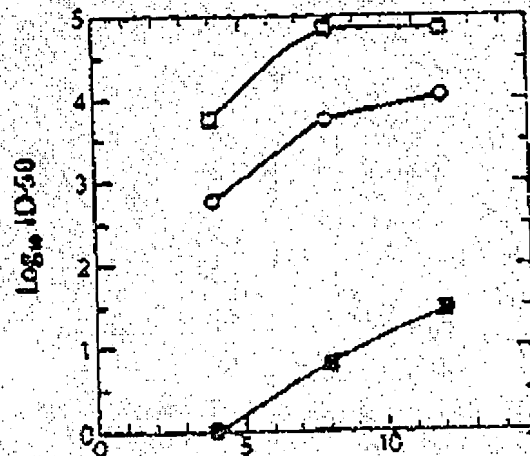


Figure 18B



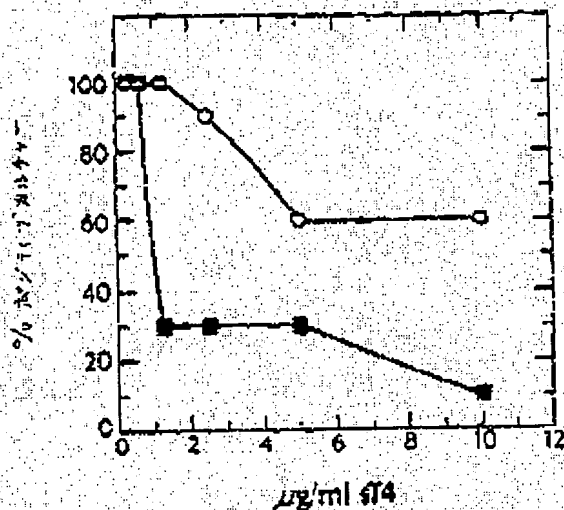
特表平2-50326

手続補正書

平成元年

特許庁長官 吉田 文 毅 殿

Figure 18C



1. 事件の表示 PCT/US 89/00762

2. 発明の名称 可溶性T4の誘導体

3. 補正をする者
事件との関係 特許出願人

名 称 ザ・トラスティーズ・オブ・コロニ
ユニヴァーシティ・イン・ザ・ステ
ニユー・ヨーク (ほか1名)

4. 代 理 人 東京都新宿区新宿 1丁目 1番14号 1
(郵便番号 100) 電話 (03) 354-1
(6200) 弁護士 川 口 義
(ほか2名)

5. 補正命令の日付 前 発

6. 補正により追加する発明の数 な し

7. 補正の対象 明細書の翻訳文及び請求の範囲の翻訳

8. 補正の内容
(1) 鮮明な明細書の翻訳文及び鮮明な請求の範囲の翻訳
文の通り補充する。

方式
送付

国 際 特 許 補 正

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl. 4 - C12N 7/00; A61K 37/03; C07H 12/00 V.3. Cl. - 425/240.1, 425/240.2, 425/240.3, 425/240.4, 425/240.5, 425/240.6, 425/240.7, 425/240.8, 425/240.9, 425/240.10, 425/240.11, 425/240.12, 425/240.13, 425/240.14, 425/240.15, 425/240.16, 425/240.17, 425/240.18, 425/240.19, 425/240.20, 425/240.21, 425/240.22, 425/240.23, 425/240.24, 425/240.25, 425/240.26, 425/240.27, 425/240.28, 425/240.29, 425/240.30, 425/240.31, 425/240.32, 425/240.33, 425/240.34, 425/240.35, 425/240.36, 425/240.37, 425/240.38, 425/240.39, 425/240.40, 425/240.41, 425/240.42, 425/240.43, 425/240.44, 425/240.45, 425/240.46, 425/240.47, 425/240.48, 425/240.49, 425/240.50, 425/240.51, 425/240.52, 425/240.53, 425/240.54, 425/240.55, 425/240.56, 425/240.57, 425/240.58, 425/240.59, 425/240.60, 425/240.61, 425/240.62, 425/240.63, 425/240.64, 425/240.65, 425/240.66, 425/240.67, 425/240.68, 425/240.69, 425/240.70, 425/240.71, 425/240.72, 425/240.73, 425/240.74, 425/240.75, 425/240.76, 425/240.77, 425/240.78, 425/240.79, 425/240.80, 425/240.81, 425/240.82, 425/240.83, 425/240.84, 425/240.85, 425/240.86, 425/240.87, 425/240.88, 425/240.89, 425/240.90, 425/240.91, 425/240.92, 425/240.93, 425/240.94, 425/240.95, 425/240.96, 425/240.97, 425/240.98, 425/240.99, 425/240.100	
2. FIELD OF INVENTION U.S. 4,357,240.1, 4,357,240.2, 4,357,240.3, 4,357,240.4, 4,357,240.5, 4,357,240.6, 4,357,240.7, 4,357,240.8, 4,357,240.9, 4,357,240.10, 4,357,240.11, 4,357,240.12, 4,357,240.13, 4,357,240.14, 4,357,240.15, 4,357,240.16, 4,357,240.17, 4,357,240.18, 4,357,240.19, 4,357,240.20, 4,357,240.21, 4,357,240.22, 4,357,240.23, 4,357,240.24, 4,357,240.25, 4,357,240.26, 4,357,240.27, 4,357,240.28, 4,357,240.29, 4,357,240.30, 4,357,240.31, 4,357,240.32, 4,357,240.33, 4,357,240.34, 4,357,240.35, 4,357,240.36, 4,357,240.37, 4,357,240.38, 4,357,240.39, 4,357,240.40, 4,357,240.41, 4,357,240.42, 4,357,240.43, 4,357,240.44, 4,357,240.45, 4,357,240.46, 4,357,240.47, 4,357,240.48, 4,357,240.49, 4,357,240.50, 4,357,240.51, 4,357,240.52, 4,357,240.53, 4,357,240.54, 4,357,240.55, 4,357,240.56, 4,357,240.57, 4,357,240.58, 4,357,240.59, 4,357,240.60, 4,357,240.61, 4,357,240.62, 4,357,240.63, 4,357,240.64, 4,357,240.65, 4,357,240.66, 4,357,240.67, 4,357,240.68, 4,357,240.69, 4,357,240.70, 4,357,240.71, 4,357,240.72, 4,357,240.73, 4,357,240.74, 4,357,240.75, 4,357,240.76, 4,357,240.77, 4,357,240.78, 4,357,240.79, 4,357,240.80, 4,357,240.81, 4,357,240.82, 4,357,240.83, 4,357,240.84, 4,357,240.85, 4,357,240.86, 4,357,240.87, 4,357,240.88, 4,357,240.89, 4,357,240.90, 4,357,240.91, 4,357,240.92, 4,357,240.93, 4,357,240.94, 4,357,240.95, 4,357,240.96, 4,357,240.97, 4,357,240.98, 4,357,240.99, 4,357,240.100	
3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Y Cell, vol. 42, issued August 1982, Madison, The Isolation and Nucleotide Sequence of a cDNA Encoding the T Cell Surface Protein T4: A New Member of the Immunoglobulin Gene Family, pp. 22-104, See entire document. 1-3 Y ISBU (INTERNATIONAL COUNCIL OF SCIENTIFIC UNIONS) REPORTS, vol. 2, Advances in Gene Technology: Molecular Biology of the Immune System, issued 1983, Lissman, The Isolation and Structure of the Genes Encoding the Human T Cell Molecules T4 and T8, pp. 233, 234, See the entire article 1-2	

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl. 4 - C12N 7/00; A61K 37/03; C07H 12/00 V.3. Cl. - 425/240.1, 425/240.2, 425/240.3, 425/240.4, 425/240.5, 425/240.6, 425/240.7, 425/240.8, 425/240.9, 425/240.10, 425/240.11, 425/240.12, 425/240.13, 425/240.14, 425/240.15, 425/240.16, 425/240.17, 425/240.18, 425/240.19, 425/240.20, 425/240.21, 425/240.22, 425/240.23, 425/240.24, 425/240.25, 425/240.26, 425/240.27, 425/240.28, 425/240.29, 425/240.30, 425/240.31, 425/240.32, 425/240.33, 425/240.34, 425/240.35, 425/240.36, 425/240.37, 425/240.38, 425/240.39, 425/240.40, 425/240.41, 425/240.42, 425/240.43, 425/240.44, 425/240.45, 425/240.46, 425/240.47, 425/240.48, 425/240.49, 425/240.50, 425/240.51, 425/240.52, 425/240.53, 425/240.54, 425/240.55, 425/240.56, 425/240.57, 425/240.58, 425/240.59, 425/240.60, 425/240.61, 425/240.62, 425/240.63, 425/240.64, 425/240.65, 425/240.66, 425/240.67, 425/240.68, 425/240.69, 425/240.70, 425/240.71, 425/240.72, 425/240.73, 425/240.74, 425/240.75, 425/240.76, 425/240.77, 425/240.78, 425/240.79, 425/240.80, 425/240.81, 425/240.82, 425/240.83, 425/240.84, 425/240.85, 425/240.86, 425/240.87, 425/240.88, 425/240.89, 425/240.90, 425/240.91, 425/240.92, 425/240.93, 425/240.94, 425/240.95, 425/240.96, 425/240.97, 425/240.98, 425/240.99, 425/240.100	
2. FIELD OF INVENTION U.S. 4,357,240.1, 4,357,240.2, 4,357,240.3, 4,357,240.4, 4,357,240.5, 4,357,240.6, 4,357,240.7, 4,357,240.8, 4,357,240.9, 4,357,240.10, 4,357,240.11, 4,357,240.12, 4,357,240.13, 4,357,240.14, 4,357,240.15, 4,357,240.16, 4,357,240.17, 4,357,240.18, 4,357,240.19, 4,357,240.20, 4,357,240.21, 4,357,240.22, 4,357,240.23, 4,357,240.24, 4,357,240.25, 4,357,240.26, 4,357,240.27, 4,357,240.28, 4,357,240.29, 4,357,240.30, 4,357,240.31, 4,357,240.32, 4,357,240.33, 4,357,240.34, 4,357,240.35, 4,357,240.36, 4,357,240.37, 4,357,240.38, 4,357,240.39, 4,357,240.40, 4,357,240.41, 4,357,240.42, 4,357,240.43, 4,357,240.44, 4,357,240.45, 4,357,240.46, 4,357,240.47, 4,357,240.48, 4,357,240.49, 4,357,240.50, 4,357,240.51, 4,357,240.52, 4,357,240.53, 4,357,240.54, 4,357,240.55, 4,357,240.56, 4,357,240.57, 4,357,240.58, 4,357,240.59, 4,357,240.60, 4,357,240.61, 4,357,240.62, 4,357,240.63, 4,357,240.64, 4,357,240.65, 4,357,240.66, 4,357,240.67, 4,357,240.68, 4,357,240.69, 4,357,240.70, 4,357,240.71, 4,357,240.72, 4,357,240.73, 4,357,240.74, 4,357,240.75, 4,357,240.76, 4,357,240.77, 4,357,240.78, 4,357,240.79, 4,357,240.80, 4,357,240.81, 4,357,240.82, 4,357,240.83, 4,357,240.84, 4,357,240.85, 4,357,240.86, 4,357,240.87, 4,357,240.88, 4,357,240.89, 4,357,240.90, 4,357,240.91, 4,357,240.92, 4,357,240.93, 4,357,240.94, 4,357,240.95, 4,357,240.96, 4,357,240.97, 4,357,240.98, 4,357,240.99, 4,357,240.100	
3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Y Cell, vol. 42, issued August 1982, Madison, The Isolation and Nucleotide Sequence of a cDNA Encoding the T Cell Surface Protein T4: A New Member of the Immunoglobulin Gene Family, pp. 22-104, See entire document. 1-3 Y ISBU (INTERNATIONAL COUNCIL OF SCIENTIFIC UNIONS) REPORTS, vol. 2, Advances in Gene Technology: Molecular Biology of the Immune System, issued 1983, Lissman, The Isolation and Structure of the Genes Encoding the Human T Cell Molecules T4 and T8, pp. 233, 234, See the entire article 1-2	

M. DOCUMENTS COMMISSION TO BE REVIEWED 100-THIRTY-FOUR SECOND SHEET		
Category	Number of Documents	Number of Documents
U	Nature, Vol. 312, issued December 1984. DePamphilis, "The CD4 (74) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus", pp. 763-766. See the entire document.	1-5
X	Cell, Vol. 40, Issue 1, September 1987. Lasky, "Delineation of a Region of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp 120 Glycoprotein critical for interaction with the CD4 Receptor", pp. 975-983. See entire article.	1-14

第1頁の続き

①Int. Cl. ⁹	識別記号	特許整理番号
A 61 K 37/02	ADY	8815-4C
C 07 K 13/00		8619-4H
C 12 N 5/10	ZNA	
C 12 P 15/48		
C 12 R 21/02		
C 12 R 1:91		

④発明者 アクスル、リチャード

④発明者 スワイト、レイモンド・ダブリュ

④発明者 アーソス、ジェームズ

④出願人 スミスクライン・ベクマン・コーポレイション

アメリカ合衆国、ニューヨーク・10027、ニュー・ヨーク・サイド・ドライブ・445

アメリカ合衆国、ペンシルベニア・19004、バラ・シン・エツジビル・ロード・108

アメリカ合衆国、ミシガン・48104、アン・アーバ、ヒル・ート・2028

アメリカ合衆国、ペンシルベニア・19101、フィラデル・フランクリン・プラザ・1